

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Martina Foučková

Delimitace druhů u lobosních měňavek

Species delimitation in lobose amoebae

Bakalářská práce

Školitel:

prof. RNDr. Ivan Čepička, Ph.D.

Praha, 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Ivana Čepičky, Ph.D a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 8. 6. 2020

Martina Foučková

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Ivanu Čepičkovi, Ph.D. za čas a ochotu, které mi věnoval a za rady, bez kterých bych se při psaní této práce neobešla.

Abstrakt

Lobosní měňavky – měňavky vytvářející lobopodie – se vyskytují napříč skupinami Amoebozoa, Excavata, Rhizaria, a v rodu *Anaeramoeba* s nejasným postavením. Pro jejich druhovou delimitaci (tj. vymezení hranic pro odlišení jednotlivých druhů od sebe) jsou nejčastěji používané morfologické znaky, které bylo možné dokumentovat i v minulosti, jako je velikost a tvar těla, vzhled hyalinní zóny, panožek a subpseudopodií, granuloplazma s cytoplazmatickými inkluzemi, počet a velikost jader, tvar uroidu a podoba případné cysty. Dále jsou používány znaky na ultrastruktuře, kterými jsou ultrastruktura jádra, jadérka, povrchových útvarů a organel. Díky molekulárním metodám se dnes druhy popisují a rozlišují také díky sekvenování genu pro SSU rRNA a aktin, COI barcodingu a sekvencí ITS a je tak možné odhalovat i kryptické druhy. Před sekvenováním se pro molekulární popis druhů využívalo také technik RFLP, RAPD a izozymů. Tato práce hodnotí význam jednotlivých znaků používaných pro druhovou delimitaci lobosních měňavek na příkladu vybraných 125 druhů ze skupiny Amoebozoa (řádů Acanthamoebida, Pellitida, Himatismenida, Dermamoebida, Thecamoebida, Vannellida, Dactylopodida, Squamocutida, Variopodida, Euamoebida, Leptomyxida a Echinamoebida), Heterolobosea a Anaeramoebidae.

Klíčová slova: barcoding, druhová delimitace, kryptické druhy, měňavka, molekulární fylogenetika, morfologie, ultrastruktura

Abstract

Lobose amoebae – amoebas that create lobopodia – are distributed among the supergroup Amoebozoa, Excavata, Rhizaria and the genus *Anaeramoeba* (Eukaryota *incertae sedis*). For their species delimitation (i.e., pinpointing boundaries between particular species), morphological features are used most often, such as the size and shape of the cell, appearance of the hyaloplasm, pseudopodia and subpseudopodia, granuloplasm with cytoplasmatic inclusions, number and size of nuclei, shape of the uroid and cysts if present. The morphological characteristics are easily documented using a light microscope. Ultrastructural features, such as the ultrastructure of nuclei and nucleoli, surface structures, and organelles, are used as well. Nowadays, species are also described and distinguished employing molecular methods, mostly analyses of the SSU rRNA and actin genes, COI barcoding, and ITS sequences, which allow detection of cryptic species. Before the sequencing era, RFLP, RAPD and isozymes methods were also used for delimitation of species. This thesis focuses on particular methods and features used for species delimitation of lobose amoebae on the basis of 125 selected species belonging to Amoebozoa (orders Acanthamoebida, Pellitida, Himatismenida, Dermamoebida, Thecamoebida, Vannellida, Dactylopodida, Squamocutida, Variopodida, Euamoebida, Leptomyxida and Echinamoebida), Heterolobosea, and Anaeramoebida.

Keywords: amoebas, barcoding, cryptic species, molecular phylogenetics, morphology, species delimitation, ultrastructure

Obsah

Úvod	1
1. Seznam použitých druhů	2
2. Buňka měňavky	3
3. Typy znaků používaných k odlišování druhů lobosních měňavek	5
4. Morfologie.....	6
4.1. Velikost a tvar těla	6
4.2. Hyalinní zóna	7
4.3. Panožky a subpseudopodie	8
4.4. Granuloplazma a cytoplazmatické inkluze	10
4.5. Počet a velikost jader	11
4.6. Uroid a posteriorní vlákna	12
4.7. Cysta	13
5. Ultrastruktura	13
5.1. Struktura a tvar jádra.....	13
5.2. Velikost, tvar a poloha jadérka	14
5.3. Povrch buňky	15
5.3.1. Šupiny.....	15
5.3.2. Glykokalyx	16
5.4. Orgány a cytoplazmatické inkluze.....	17
5.5. MTOC (centrozom)	18
6. Molekulární fylogenetika	18
6.1. Geny pro SSU rRNA a aktin.....	19
6.2. COI a ITS barcoding.....	20
6.3. RFLP, RAPD, izozymy	22
6.4. Kryptické druhy	22
7. Fyziologie.....	23
8. Závěr.....	24
9. Zdroje	26

Úvod

Lobosními měňavkami jsou myšleny takové měňavky, které vytvářejí lobopodie – široké, lalokovité panožky. Dalšími základními typy panožek jsou axopodie, filopodie a retikulopodie (Claußen a Schmidt, 2017). Lobosní měňavky se vyskytují napříč eukaryotickými superskupinami a nejsou tak součástí jednotné, monofyletické skupiny. Díky své morfologické podobnosti (hlavně přítomnosti lobopodií) se ale v minulosti řadily do společné skupiny. Do původní skupiny Lobosea se řadily měňavky z dnešní skupiny Amoebozoa, Excavata – z nich konkrétně heterolobosní měňavky – a Rhizaria (Levine a kol., 1980).

V této práci se budu zaměřovat na delimitaci druhů (tj. vymezení hranic pro odlišení jednotlivých druhů měňavek) primárně v superskupině Amoebozoa a to hlavně na skupiny Discosea, Tubulinea a zčásti i Evosea, ve které jsou některé měňavky velmi podobné měňavkám ze skupiny Discosea. Ve skupině Evosea se vyhnu hlenkám, které vytvářejí plodničky a ve skupině Tubulinea se vyhnu skupinám Arcellinida, Microcoryciidae a Trichosida, které vytvářejí schránky a druhová delimitace s pomocí měňavek se tak u nich většinou nepoužívá. Heterolobosním měňavkám se budu věnovat převážně v molekulární části této práce, protože měňavka je v této skupině nejméně důležitým stádiem pro rozlišení druhů kvůli své nízké morfologické variabilitě (Pánek a kol., 2014). A dále se také budu zabývat relativně nedávno objeveným rodem *Anaeramoeba* (Táborský a kol., 2017), zatím spadající do skupin eukaryot s nejasným postavením, ale morfologicky velmi podobným měňavkám ze skupiny Discosea. Úvahy obsažené v této práci zakládám na setu reprezentativních článků zahrnující popis, morfologickou a obvykle i molekulární charakterizaci 125 druhů (z celkových přibližně 400; viz citace). Tyto druhy a citace na články jsou uvedené v následující kapitole, v dalších kapitolách jsou pak uvedené pouze některé příklady, které zastupují obecné tendence vyplývající ze zmíněných článků.

Klasické biologické pojetí druhů je u lobosních měňavek těžko aplikovatelné, protože u nich nebylo pozorované žádné sexuální rozmnožování. Historicky se proto druhy rozlišovaly výhradně morfologicky, dnes se využívá i jejich odlišné ultrastruktury a molekulární charakterizace. Cílem této práce je postupně shrnout tyto znaky a zhodnotit jejich důležitost pro rozlišení u jednotlivých taxonů.

1. Seznam použitých druhů

Druhy ze skupiny **Discosea**, řádu **Acanthamoebida**: *Acanthamoeba byersi* (Qvarnstrom a kol., 2013)¹, *A. culbertsoni*, *A. castellanii*, *A. jacobsi* (Sawyer a kol., 1992)², *A. tubiashi* (Lewis a kol., 1979), *A. sohi* (Im a Shin, 2003), *Luapelamoeba hula* (Shadwick a kol., 2016), *Protacanthamoeba bohémica* (Dyková a kol., 2005); **Pellitida**: *Pellita catalonica*, *P. digitata* (Smirnov a Kudryavtsev, 2005), *Endostelium crystalliferum*, *E. zonatum* (Kudryavtsev a kol., 2014); **Himatismenida**: *Cochliopodium larifeili* (Kudryavtsev, 1999), *C. jaguari*, *C. marrii*, *C. crystalli* (Melton a kol., 2019), *C. arabianum* (Tekle a kol., 2015), *C. gallicum*, *C. megatetrastylus* (Anderson a Tekle, 2013), *C. pentatrifurcatum* (Tekle a kol., 2013), *C. spiniferum* (Kudryavtsev, 2004), *C. barki* (Kudryavtsev a kol., 2004), *Parvamoeba monoura* (Cole, 2010), *Ovalopodium desertum* (Kudryavtsev a kol., 2011), **Dermamoebida**: *Dermamoeba algensis* (Smirnov, 2017), *Paradermamoeba levis* (Smirnov a Goodkov, 1994), *Mayorella vespertilioides* (Mrva, 2011) a *M. gemmifera* (Dykova, 2008); **Thecamoebida**: *Thecamoeba cosmophorea* (Mesentsev a Smirnov, 2019), *T. aesculea* (Kudryavtsev a Hausman, 2009), *T. munda* (Smirnov, 1999), *Stenamoeba limacina*, *S. amazonica* (Dykova a kol., 2010), *S. polymorpha* (Peglar a kol., 2016), *S. berchidia*, *S. sardiensis* (Geisen a kol., 2014), *Sappinia diploidea* (Michel a kol., 2006) a *Sappinia platani* (Wylezich a kol., 2015); **Vannellida**: *Vannella peregrinia* (Smirnov a Fenchel, 1996), *V. persistens* (Smirnov a kol., 2000), *V. ebro* (Smirnov, 2001), *V. epipetala* (Amaral-Zettler a kol., 2006), *V. croatica* (Smirnov a kol., 2016), *Ripella decalvata*, *R. tribonema* (Kudryavtsev a Gladkikh, 2017), *Paravanella minima* (Kudryavtsev, 2014); **Dactylopodida**: *Vexillifera multispinosa*, *V. fluvialis*, *V. tasmaniana* (Kostka, 2011), *V. abyssalis*, *V. kereti* (A. Kudryavtsev a kol., 2018), *Korotnevella diskophora* (Smirnov, 1999), *K. limbata*, *K. heteracantha* (Udalov, 2015), *K. fousa* (Udalov, 2016), *K. novozelandica* (Udalov a kol., 2017), *Paramoeba atlantica* (Kudryavtsev a Pawlowski, 2011), *Pseudoparamoeba microlepis* (Udalov, 2016), *P. perniciosa* (Sprague a kol., 1969), *P. aparasomata* (Volkova a kol., 2019), *P. garorimi* (Udalov a kol., 2016), *Neoparamoeba longipodia* (Volkova a Kudryavtsev, 2017), *Cunea profundata*, *C. thuwala* (Kudryavtsev a Pawlowski, 2015) a *C. russae* (Kudryavtsev a Volkova, 2020).

Ze skupiny **Evosea**, řádu **Squamocutida**: *Squamoeba japonica* (A. Kudryavtsev a Pawlowski, 2012), *Sapocribrum chincoteaguense* (Lahr a kol., 2015), *Armaparvus languidus* (Schuler a Brown, 2018); **Variopodida**: *Flamella tiara* (Fishbeck, 1993), *F. aegyptia*, *F. lacustris* (Michel a Smirnov, 1999), *F. balnearia*, *F. arnhemensis*, *F. fluviatilis* (Kudryavtsev a kol., 2009), *F. piscinae* (Walthall a kol., 2016), *F. daurica* (Glotova a Smirnov, 2017), *F. beringiana*, *F. pleistocenia* (Shmakova a kol., 2016).

¹ V závorce jsou uvedené citace článků

² Citace se vztahuje ke všem předchozím druhům, v článku je popsáno více druhů

Ze skupiny **Tubulinea**, řádu **Euamoebida**: *Amoeba algonquinensis* (Baldock, 1983), *A. borokensis* (Kalinina a kol., 1986), *A. taylorae* (Hayes, 1955), *Copromyxa laresi* (Kostka a kol., 2017), *Saccamoeba marina* (Anderson a kol., 1997) a *S. lacustris* (Corsaro a kol., 2010); **Leptomyxida**: *Leptomyxa valladaresi* (Del Valle a kol., 2017), *L. ambigua* (Smirnov, 2018), *Rhizamoeba schnepfii* (Kühn, 1997), *R. neglecta* (Smirnov a kol., 2009); **Echinamoebida**: *Echinamoeba thermarum* (Baumgartner a kol., 2003).

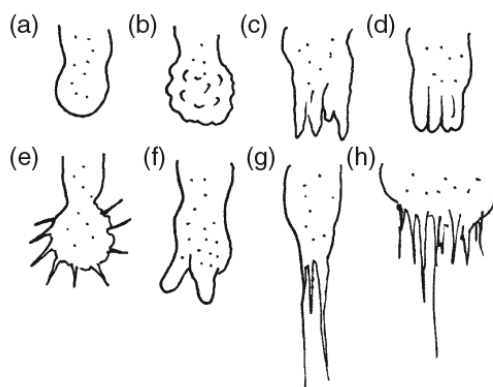
Dále ze skupiny **Anaeramoebidae**: *Anaeramoeba flamelloides*, *A. ignava*, *A. oblonga*, *A. megacephala*, *A. parva* a *A. gargantua* (Táborský a kol., 2017) a nakonec ze skupiny **Heterolobosea**: *Pharyngomonas turkanaensis* (Park a Simpson, 2016), *Vahlkampfia caledonica* (Anderson a kol., 1997), *V. signyensis* (Garstecki a kol., 2005), *Paravahlkampfia lenta* (Brown a De Jonckheere, 2004), *P. francinae* (Visvesvara a kol., 2009), *Neovahlkampfia nana* (Tymł a kol., 2017) *Tetramitus russelli*, *T. pararusselli* (De Jonckheere a kol., 2005), *T. thermacidophilus* (Baumgartner a kol., 2009), *T. angularis*, *T. parangularis* (Robinson a kol., 2007), *T. rostratus* (Brent, 1954), *Naegleria polaris*, *N. neopolaris*, *N. arctica*, *N. neoantarctica*, *N. neochilensis*, *N. neodobsoni*, *N. spitzbergenensis*, *N. paradobsoni* (De Jonckheere, 2006a), *N. dunnebackei* (Visvesvara a kol., 2005), *N. canariensis* (De Jonckheere, 2006b), *Tulamoeba peronaphora* (Park a kol., 2009), *T. bucina* (Kirby a kol., 2015), *Sawyeria marylandensis*, *M. visvesvarai*, (O' Kelly a kol., 2003), *Monopylocysis minor*, *M. robusta*, *M. elegans*, *M. disparita*, *Pseudoharpagon longus*, *P. pertyi*, *P. tertius* (Pánek a kol., 2014) a *Psalteriomonas magna* (Pánek a kol., 2012).

2. Buňka měňavky

Přestože jsou nahé lobosní měňavky tvořené pouze jedinou buňkou, nemají žádné bičíky a ani žádnou schránku, jejich vzhled je velmi různorodý.

Jejich tělo je tvořené granuloplazmou, což je ta část buňky, která obsahuje veškeré orgány, granulky, krystaly a další cytoplazmatické inkluze, a průhlednou hyaloplazmou, vyskytující se obvykle na okrajích buňky. Hyaloplazma a často i granuloplazma se podílí na tvorbě panožek (pseudopodií), což jsou proměnlivé výběžky těla, které se uplatňují při pohybu celé buňky a v případě lobopodií mají široké, zakulacené okraje. Vzhled těchto okrajů ale může být ovlivněn přítomností subpseudopodií, což jsou malé vytrvávající hyalinní výběžky panožek, a vytvářet tak například akantopodie u rodu *Acanthamoeba* (viz dále). U subpseudopodií dosud nebyla zjištěna funkce, představují však stabilní znak na buňce měňavek. V zadní části těla se pak mohou tvořit uroidální sturktury, které slouží převážně k uchycení těla k podkladu. Jsou tvořeny hlavně u těch měňavek, které nemají

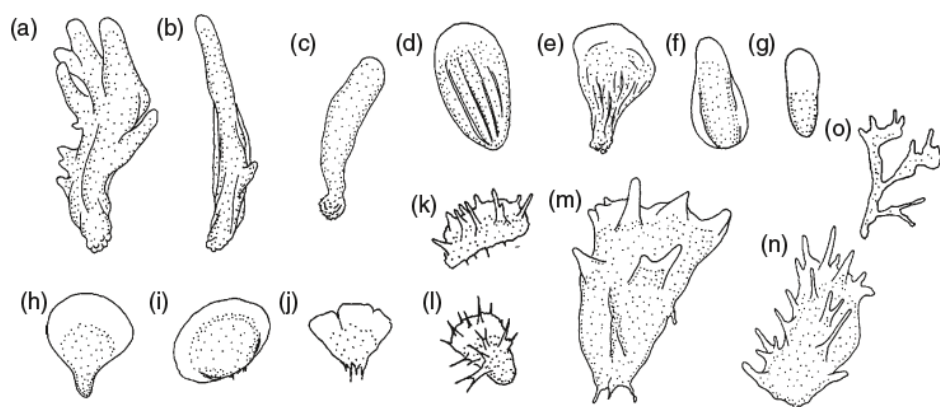
vytvořený silný glykokalyx. Podle vzhledu se uroid rozlišuje jako „bulbous“, „morulate“, „fasciculate“, „plicate“, „villous-bulbous“ a také může mít posteriorní hyalinní laloky nebo adhezivní vlákna (obr. 1).



Obr. 1: Typy uroidů měňavek – (a) „bulbous“, (b) „morulate“, (c) „fasciculate“, (d) „plicate“, (e) „vilous-bulbous“, (f) posteriorní hyalinní laloky, (g) a (h) vlákna (Smirnov, 2009)

Povrch buňky je obalen pláštěm – glykokalyxem. Ten může být vláknitý, amorfní, může obsahovat různé šupinky, tvořit glykostyly (prodloužené, polysacharidové útvary) nebo může mít mnoho vrstev a tvořit takzvanou kutikulu (Smirnov, 2009). U některých měňavek může glykokalyx pokrývat pouze dorzální část buňky a tvořit tektum (Smirnov, 2005).

Podle celkového vzhledu, počtu panožek, pohybu cytoplazmy, případné tvorby vrás a záhybů při orientovaném pohybu a tvaru okraje buňky se u měňavek určuje morfotyp. Nejčastěji se rozeznává šestnáct morfotypů a to „polytactic“, „orthotactic“, „monotactic“, „striate“, „rugose“, „lanceolate“, „lingulate“, „fan-shaped“, „lens-like“, „flabellate“, „flamellian“, „acanthopodial“, „mayorelian“, „dactylopodial“ a „branched“ (obr. 2; Smirnov, 2009).



Obr. 2: Základní morfotypy lobosních měňavek – (a) „polytactic“, (b) „orthotactic“, (c) „monotactic“, (d) „striate“, (e) „rugose“, (f) „lanceolate“, (g) „lingulate“, (h) „fan-shaped“, (i) „lens-like“, (j) „flabellate“, (k) „flamellian“, (l) „acanthopodial“, (m) „mayorelian“, (n) „dactylopodial“, (o) „branched“ (Smirnov, 2009)

Součástí granuloplazmy jsou organely, z nichž nejvýraznější bývá jádro. Jádro může být buď vesikulární s jedním centrálním jadérkem, nebo granulární s větším množstvím malých jadérek. Uvnitř jádra se nachází jaderná lamina, která může být složená z vrstvy jemných vláken, nebo je „plástvovitá“ z šestihranných struktur. Další výraznou organelou je mitochondrie. Mitochondrie má u měňavek krystalové protáhlé (tubulární) nebo zploštělé (diskoidální). Golgiho aparát bývá zorganizovaný do diktyosomu (plochých váčků navrstvených na sebe, např. u Amoebozoa; Smirnov a Brown, 2004), tento typický vzhled ale mohou některé měňavky postrádat – např. měňavky ze skupiny Heterolobosea (Pánek a kol., 2012). Součástí granuloplazmy jsou i cytoplasmatické inkluze jako jsou krystaly, lipidové granule, potravní vakuoly, u sladkovodních měňavek kontraktilní vakuoly a – pokud se u konkrétního druhu vyskytují – i symbiotické organismy (Smirnov a Brown, 2004).

3. Typy znaků používaných k odlišování druhů lobosních měňavek

Většina znaků, která se používá pro popis druhů měňavek a jejich odlišování, není používána samostatně, ale v kombinaci. Tak je to hlavně kvůli vysoké vnitrodruhové variabilitě, kmeny jednoho druhu tak mohou mít například velké rozpětí velikosti buňky a v závislosti na velikosti i velké rozpětí velikosti jádra, ale jinak mohou být vzhledově i molekulárně totožné a tvořit tak jeden druh (např. *Stenamoeba polymorpha* – Thecamoebida; Peglar a kol., 2016). Kombinace znaků ale nejsou pevně dané a většinou se stanovují pro každý druh zvlášť – například pro druh *Sappinia platani* (Thecamoebida) je to kombinace větší velikosti buňky, menší velikosti cysty, přítomnosti diktyozomu a tvorby pláště odlišného od ostatních druhů rodu (Wylezich a kol., 2015).

Naopak některé znaky – hlavně tvar glykostylů a šupin na plášti měňavek – mohou samy stačit k odlišení blízkých příbuzných druhů. Například rozdělení druhů rodu *Korotnevella* (Dactylopodida) na základě unikátní morfologie šupin odpovídá fylogenetickým stromům vytvořených pomocí analýz genu pro SSU rRNA (tj. gen pro molekulu RNA v malé podjednotce ribosomu; Udalov a kol., 2017).

4. Morfologie

Morfologické znaky měňavek jsou dobře patrné při jejich pozorování pomocí světelného mikroskopu, proto dříve sloužily jako hlavní způsob pro rozlišení druhů. I dnes jsou velmi důležité pro popis druhů, ale pro samotné rozlišení druhu už většinou nestačí a je třeba je kombinovat s molekulárními daty.

Takto pozorovanými znaky jsou velikost a tvar těla (morfotyp), případná přítomnost vrás na povrchu těla, tvar panožek a subpseudopodií, vzhled uroidu, velikost hyalinní zóny a vzhled granuloplazmy. Dále se tak také dají pozorovat struktury obsažené v granuloplazmě, jako je jádro (jeho velikost a počet), některé organely a cytoplazmatické inkluze, a to hlavně krystaly nebo symbiotické organismy.

4.1. Velikost a tvar těla

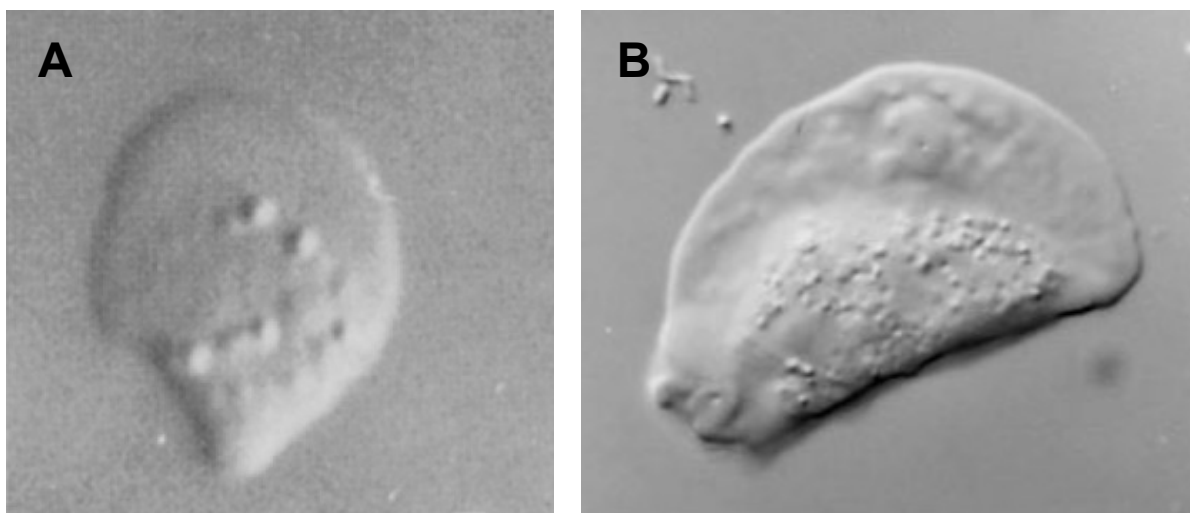
Velikost a tvar těla měňavky jsou velmi nápadné a lehko zaznamenateľné znaky, proto se při popisu nových druhů vždy udávají. Přestože měňavky mohou tvořit více forem – jako je například forma vznášivá, která také může být důležitým druhovým znakem – je nejčastěji pro srovnání používaná forma pohybující se orientovanou lokomocí, tj. měňavka přisedlá na podklad a pohybující se jedním, stálým směrem.

Velikost buňky měňavky je významná například u druhu *Vannella peregrinia* (Vannellida), která má tělo dlouhé 9 μm , a je tak výrazně menší než ostatní druhy stejného rodu, u kterých se délka těla pohybuje kolem 30 μm (Smirnov a Fenchel, 1996). U rodu *Korotnevella* (Dactylopodida) se tak dá rozlišit druh *K. heteracantha*, s délkou 50 μm od druhu *K. bulla* s délkou 80 μm , které jsou si jinak svojí morfologií velmi podobné (Udalov, 2015). Velikost buňky byla pro odlišení od ostatních druhů použita u 37 ze 125 druhů, zahrnutých do této práce, ale nikdy nebyla použita samostatně, vždy byla doprovázená dalšími rozlišujícími morfologickými znaky, protože může být velmi variabilní dokonce i mezi kmeny v rámci jednoho druhu. Například jedinci druhu *Stenamoeba polymorpha* (Thecamoebida) mohou mít rozpětí délky těla 12-33 μm (Peglar a kol., 2016).

Tvar těla je daný poměrem délky a šířky těla, čím je poměr větší, tím protáhlejší buňka je. Tento poměr je jedním z důležitých rozlišovacích znaků u řádu Vannellida, kdy se liší například *Vannella peregrinia* s poměrem délky a šířky 1,1 (obr. 3A; Smirnov a Fenchel, 1996) od druhu *V. ebro* s poměrem 0,75 (obr. 3B; Smirnov, 2001). Kromě poměru délky a šířky se může celkový tvar těla lišit vzhledem při lokomoci u jinak vzájemně velmi

podobných druhů. Takto se dá odlišit *Thecamoeba aesculea* (Thecamoebida) se špachtlovitým až vějířovitým, zakulaceným tělem od příbuzného a podobného druhu *T. sphaeronucleus* s protáhlým až kapkovitým tělem při lokomoci (Kudryavtsev a Hausman, 2009).

Dále se na povrchu některých měňavek – hlavně v rámci řádu Thecamoebida – mohou vyskytovat různé záhyby a vrásky, jejichž množství je často u druhů odlišné. Samotný počet záhybů není neměnný, proto se u jednotlivých druhů vymezuje rozmezí jejich početnosti. *Thecamoeba aesculea* má na svém povrchu vytvořených 1-5 vrás (Kudryavtsev a Hausman, 2009), zatímco *T. munda* tvoří vrás 3-6, z nichž dvě jsou navíc často rozvětvené (Srnmov, 1999). Odlišovat se mohou příbuzné druhy i samotnou přítomností vrás – například druh *Stenamoeba limacina* tvořící na svém povrchu vrásky a záhyby a druh *S. amazonica* s hladkým povrchem těla bez vrás (Dyková a kol., 2010)

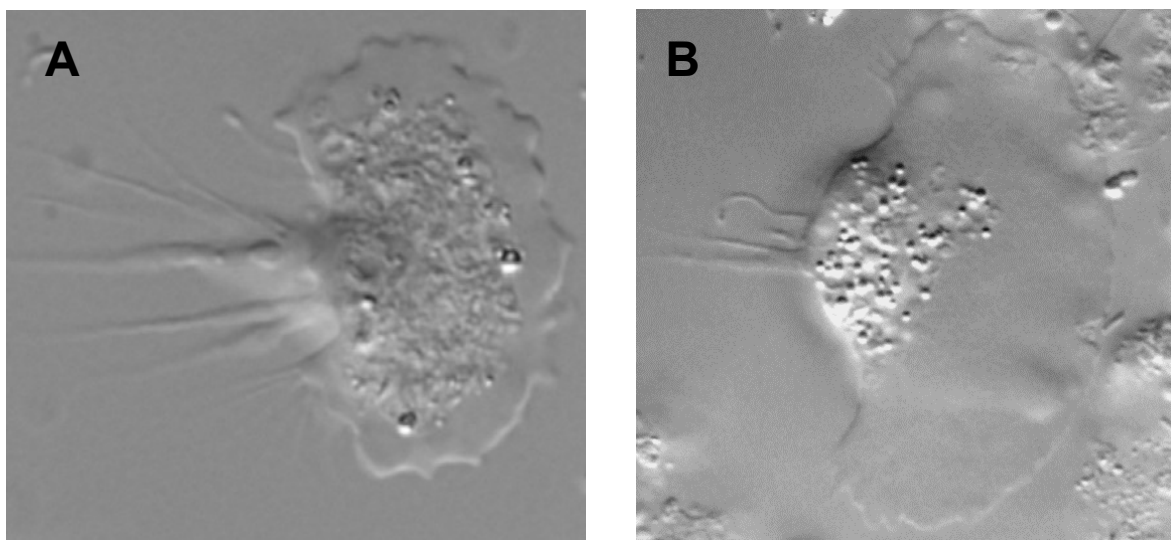


Obr. 3: Tvar těla druhu *Vannella peregrinia* (A) (upraveno podle: Smirnov a Fenchel, 1996) a druhu *Vannella ebro* (B) (upraveno podle: Smirnov, 2001)

4.2. Hyalinní zóna

Přestože hyalinní zóna bývá na první pohled velmi nápadná součást buňky, nebývá její charakter pro druhové rozlišení používán velmi často. Její proměnlivost je patrná hlavně při odlišování jednotlivých rodů, a to například rodu *Ovalopodium* (Himatismenida), který má hyalinní zónu umístěnou v anteriorní a laterální části, od příbuzného rodu *Cochliopodium*, jehož hyalinní zóna obkružuje celou buňku (Kudryavtsev a kol., 2011).

A i když se u většiny druhů pro rozlišení nepoužívá, pro pár skupin může být přeci jen významná. Například u skupiny *Anaeramoeba* je hyalinní zóna specifická pro každý druh. Liší se zde jak délkou, kterou zasahuje do celkové délky buňky, kdy může jako u druhu *Anaeramoeba ignava* zabírat pouze jednu čtvrtinu (obr. 4A) a u druhu *A. flamelloides* zabírat i více než polovinu délky buňky (obr. 4B), tak i okrajem zóny, který může být velmi zvlněný a obsahovat mnoho laloků – u druhu *A. megacephala* – anebo může být naopak téměř hladký, bez zvlnění a jiných projekcí, jako u druhu *A. gargantua* (Táborský a kol., 2017).



Obr. 4: Hyalinní zóna druhu *Anaeramoeba ignava* (A) a druhu *A. flamelloides* (B) (upraveno podle: Táborský a kol., 2017)

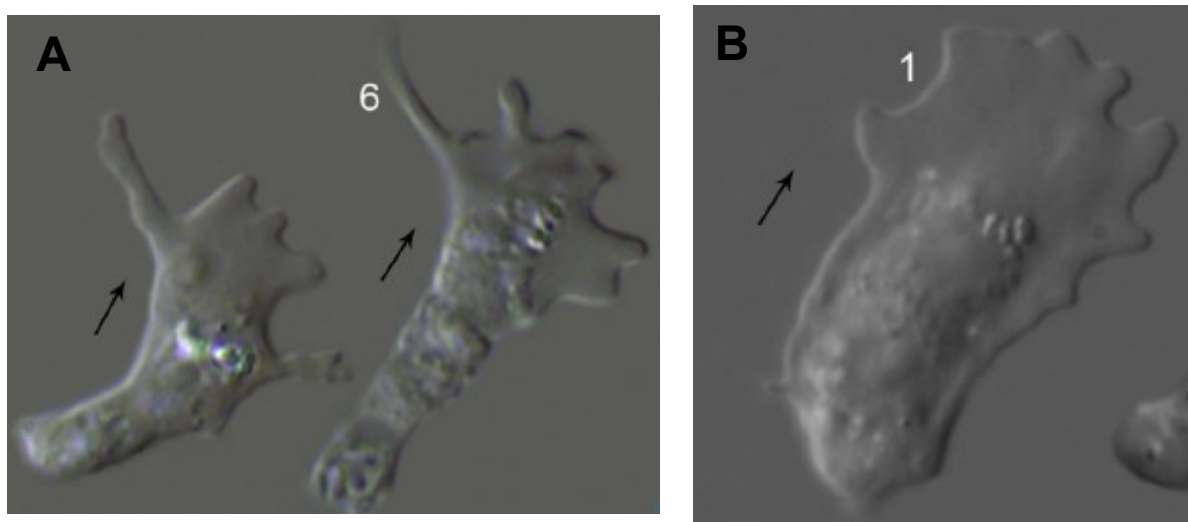
4.3. Panožky a subpseudopodie

Panožky jsou často vzhledem a stavbou typické pro rody měňavek a podle jejich vzhledu bývá vymezen i jejich morfotyp, takže v rámci druhů nebývají často rozdílné, případně jsou rozdílné pouze nepatrně. Pokud ale v případě druhů rozdílné jsou, liší se více jejich počtem než tvarem (délkou), a to téměř výhradně ve vznášivé formě měňavky. Jeden z mála příkladů, kdy se příbuzné druhy liší svým tvarem panožek, je druh *Neoparamoeba invadens* (Dactylopodida), který na rozdíl od druhu *N. branchipila* tvoří panožky protáhlé (Volkova a Kudryavtsev, 2017). Druh, u kterého je významný počet panožek při tvorbě vznášivé formy pro odlišení od příbuzného druhu, je *Thecamoeba cosmophorea* (Thecamoebida) – ta panožky nevytváří žádné, zatímco morfologicky jinak velmi podobná *T. quadrilineata* tvoří několik krátkých a tupých panožek (Mesentsev a Smirnov, 2019). Důležitý může být také

způsob vzniku panožek. U druhu *Parvamoeba monoura* (Himatismenida) panožky vznikají protržením glykokalyxu a jsou pokryté pouze cytoplazmatickou membránou, zatímco u podobného druhu *P. rugata* k žádnému protržení při jejich tvorbě nedochází a panožky jsou pokryté glykokalyxem celé (Cole, 2010).

Subpseudopodie mohou být oproti panožkám značně heterogenní i mezi druhy. Rozdílnost v tomto znaku je důležitá například pro odlišení druhů v řádu Dactylopodida, kde jsou subpseudopodie v mnoha různých tvarech, délkách a početnostech. Příkladem může být druh *Vexillifera kereti*, který se podobá druhu *V. minutissima*, ale odlišuje se od něj větším počtem subpseudopodií a jejich větší šířkou (Kudryavtsev a kol., 2018). Dále se tak také odlišuje druh *Neoparamoeba longipodia*, který má kromě několika krátkých subpseudopodií i pár subpseudopodií výrazně delších (obr. 5A), od druhu *N. aestuarina*, který má subpseudopodie krátké všechny a delší vůbec nevytváří (obr. 5B; Volkova a Kudryavtsev, 2017).

Kromě řádu Dactylopodida jsou subpseudopodie nápadně druhově odlišné například i v řádu Echinamoebida. Jejich odlišnost spočívá v míře oddělení jedné subpseudopodie od okolních. Tak je to například u druhu *Echinamoeba thermarum* a druhu *E. exundans* – zde jsou subpseudopodie od sebe „oddělenější“ (Baumgartner a kol., 2003).



Obr. 5: Subpseudopodie druhu *Neoparamoeba longipodia* (A) a *N. aestuarina* (B) (upraveno podle: Volkova & Kudryavtsev, 2017)

4.4. Granuloplazma a cytoplazmatické inkluze

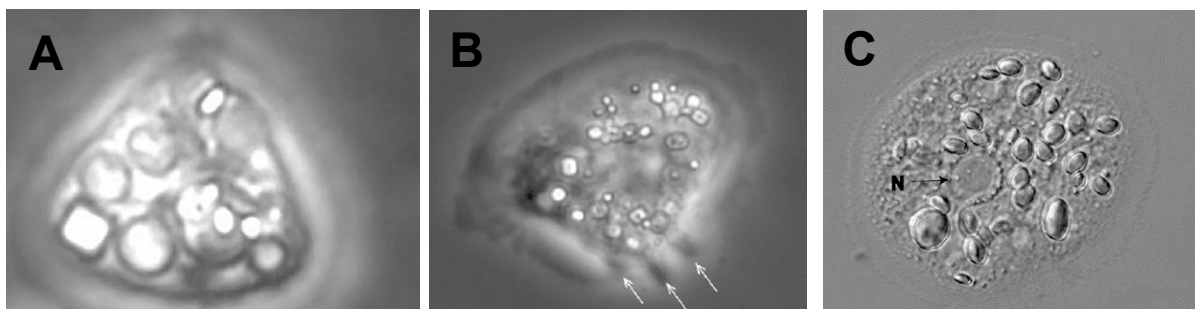
Granuloplazma sama o sobě není příliš druhově proměnlivá, co se týká tvaru a umístění v buňce. Jeden z mála druhů, který se odlišuje tvarem granuloplazmy od příbuzných druhů, je *Anaeramoeba parva* s plochou granuloplazmou odlišnou od ostatních anaeraméb s granuloplazmou výrazně vyzdvihnutou nad substrát (Táborský a kol., 2017).

Mnohem různorodější jsou ale cytoplazmatické inkluze, které se vyskytují v granuloplazmě. Na první pohled jsou nejvýraznějšími inkluzemi refraktilní krystaly. Tak je tomu například u řádu Himatismenida, mezi jehož zástupci se krystaly různí velikostí, tvarem i počtem. U druhu *Cochliopodium crystalli* jsou krystalky velké, krychlovité a je jich menší počet (kolem pěti; obr. 6A), naproti tomu u druhu *C. jaguari* je krystalků velké množství (kolem 20), jsou menší a mohou být krychlovité i kulaté (obr. 6B); u dalšího příbuzného druhu *C. marii* jsou zase velké a jsou dvojího typu – oválné krystaly, kterých je větší množství, a jeden krystal bipyramidového tvaru (obr. 6C; Melton a kol., 2019). Jinak se výskyt krystalů často liší v rámci rodů – např. druhy *Pellita catalonica* a *P. digitata* (Pellitida; Smirnov a Kudryavtsev, 2005), které neobsahují krystalky žádné se dají rozeznat od blízce příbuzného druhu *Endostelium crystalliferum*, jehož buňky obsahují desítky krystalků (Kudryavtsev a kol., 2014).

Součástí granuloplazmy jsou i symbiotické organismy – jejich přítomnost je zase často společná pro celý určitý rod měňavek, druhy se pak od sebe mohou lišit počtem symbiotických jedinců, polohou v hostitelské buňce nebo jejich stavbou. Přítomnost symbiotů ve formě „Perkinsela-like organism“, neboli PLO je typická pro většinu druhů z čeledi Paramoebidae (Dactylopodida), ale variabilita jejich přítomnosti v samotných druzích zatím není plně objasněná (Volkova a kol., 2019). U druhu *Paramoeba atlantica* výskyt jedinců v kmenech s více než dvěma symbiotickými organismy nepřesahuje 2 % z populace, zatímco druh *P. eilhardi* má zastoupení počtu symbiotů odlišné, všechny jsou ale uloženy v blízkosti jádra (Kudryavtsev a Pawlowski, 2011). Výjimkou v přítomnosti symbiotů u paraméb je *P. aparasomata*, a protože je to zatím jediný známý druh bez PLO, je popsán jako druh nový, a to hlavně na základě tohoto znaku (Volkova a kol., 2019).

Kromě cytoplazmatických inkluzí se pomocí světelné mikroskopie dá v granuloplazmě pozorovat i kontraktilní vakuola. Ta se vyskytuje u měňavek obývajících sladkovodní prostředí. Sladkovodních druhů, které by se vyskytovaly zároveň i v mořském prostředí je málo, a proto se přítomnost kontraktilní vakuoly dá k odlišení druhů snadno použít. Tak je tomu například u druhu *Pseudoparamoeba garorimi* (Dactylopodida), který

obývá mořské prostředí a nemá kontraktilní vakuolu (Udalov a kol., 2016), čímž se liší od jinak téměř morfologicky identického sladkovodního druhu *P. microlepis* (Udalov, 2016). Některé druhy se mohou také odlišovat stabilní pozicí kontraktilní vakuoly v buňce – to platí například pro druhy *Amoeba taylorae* a *A. granulosa* (Euamoebida: Hayes, 1955).



Obr. 6: Krystaly druhu *Cochliopodium crystalli* (A), druhu *C. jaguari* (B) a druhu *C. marii* (C) (upraveno podle: Melton a kol., 2019)

4.5. Počet a velikost jader

Velikost jádra je – stejně jako velikost celé buňky – v rámci jednoho druhu často velmi proměnlivá a bývá udávána v určitém rozpětí. Určení toho správného rozpětí velikostí pro jeden konkrétní druh je závislé na dalších znacích. Toto rozpětí od sebe pomáhá rozlišit například druh *Saccamoeba marina* (Euamoebida) s velikostí jádra do 6 μm a druh *S. limax* s jádrem 6-11 μm velkým (Anderson a kol., 1997). U některých druhů je ale vidět na první pohled, že se velikostí jádra liší (stejně jako se liší i celou velikostí těla). Takto je od sebe odlišen druh *Pellita catalonica* (Pellitida) s velikostí jádra 5 μm od příbuzného druhu *P. digitata* s jádrem o průměru 12 μm (Smirnov, 2005).

Odlišnost v počtu jader mezi kmeny jednoho druhu není příliš častá, proto pokud je u jedné měňavky přítomno jader více než u jiné, snadněji se tak druh identifikuje – druh *Paradermamoeba levis* (Dermamoebida), u kterého mohou být dvě nestejně velká jádra, od druhu *P. valamo* s jediným jádrem (Smirnov a Goodkov, 1994). Naopak ale také existují rody s tendencí k mnohojadernosti, u nich se musí znovu počítat s určitým rozpětím množství jader, tak je tomu například u rodu *Flamella* (Flamellidae), kdy druh *F. arnhemensis* má rozpětí počtu jader od 15 do 20 a druh *F. balnearia* má maximálně šest jader (Kudryavtsev a kol., 2009).

Druhy se mohou lišit i polohou jádra v buňce, tak je to například u druhu *Monopylocystis disparata* (Heterolobosea), jehož měňavkové stádium má jádro stabilně v přední části buňky, kdežto druh *M. elegans* má jádro posazené hlouběji v granuloplazmě (Pánek a kol., 2014). Při lokomoci může pak docházet k deformaci jádra podle toho, jak moc je jádro pružné. Lehce deformovatelné jádro je u druhu *Thecamoeba quadrilinet*a (Thecamoebida) na rozdíl od druhu *T. cosmophorea* (Mesentsev a Smirnov, 2019) a naopak druh *Monopylocystis elegans* nemá jádro oproti ostatním příbuzným druhům tolik deformované (Pánek a kol., 2012).

4.6. Uroid a posteriorní vlákna

Typů uroidu existuje více, a dokonce i u jednoho druhu měňavek se jich může vyskytovat několik. Proto druhy na základě přítomnosti jednoho určitého uroidu často není možné vymezit. Více typů uroidu je například u druhu *Rhizamoeba neglecta* (Leptomyxida), kde mohou být tři – „bulbous“, „vilous-bulbous“ nebo vláknitý (Smirnov a kol., 2009). Struktura uroidu se také může měnit v průběhu lokomoce, v závislosti na směru pohybu. Rozdílná může být také poloha uroidu na buňce. Většinou bývá vytvořen v posteriorní části buňky, tak je to například u druhu *Amoeba taylorae* (Euamoebida), ale dokonce i u příbuzných druhů, jako je *A. discoides* může být uroid vytvořený kdekoliv na hyaloplazmě (Hayes, 1955).

Druhově nejvariabilnější, co se týče přítomnosti a délky, jsou posteriorní uroidální vlákna. Tato vlákna hrají velkou roli při rozlišení druhů v rámci rodu *Flamella* (Flamellidae) a také v rámci rodu *Anaeramoeba*. Příkladem je druh *Flamella daurica* tvořící velké množství krátkých vláken (Glotova a Smirnov, 2017), *F. balnearia* tvořící jedno dlouhé vlákno a mnoho kratších, nebo příbuzná *F. fluvialis* s množstvím dlouhých vláken (Kudryavtsev a kol., 2009). U anaeraméb se liší například druh *Anaeramoeba parva*, který obvykle nemá posteriorní vlákna, od druhu *A. megacephala*, který těchto vláken často tvoří mnoho (Táborský a kol., 2017).

4.7. Cysta

I tvorba a morfologie cyst je u některých druhů velmi důležitým druhovým znakem. Dokonce i samotná přítomnost jednoho póru cysty stačila k vytvoření nového rodu – *Monopylocystis* (Heterolobosea; O' Kelly a kol., 2003). Jako hlavní způsob rozlišení druhů se cysta používala u akantaméb, kdy všechny druhy spadaly pod jeden ze tří typických morfotypů, které se vymezovaly podle velikosti, podle množství a šířky obalů (ektocysty i endocysty), přítomnosti víčka nebo množství pórů (Pussard a Pons, 1977; cit. podle Visvesvara, 1991). Později, s nástupem molekulárních metod, se však ukázalo, že se druhy akantaméb v rámci morfologických skupin značně liší a bylo nutné zavést skupiny podle sekvencí DNA (Stothard a kol., 1998). Také to, zda se cysta vůbec vytvoří, velmi závisí na způsobu kultivace kmenů a na stádiu životního cyklu, proto se od tohoto znaku pro popis nových druhů ustupuje (Stratford a Griffiths, 1978).

5. Ultrastruktura

Ultrastrukturní znaky jsou znaky pozorované pomocí transmisního a skenovacího elektronového mikroskopu. Tento typ mikroskopie se v rámci rozpoznávání znaků u jednotlivých druhů používá zejména pro pozorování povrchových struktur – stavby glykokalyxu a přítomnosti a stavby glykostylů a povrchových šupin a případně i přítomnosti kutikuly. Dále se tak dá snadno rozpoznat struktura jádra, struktura a poloha jadérka a obecně i struktura jednotlivých organel (např. charakter mitochondriálních krist), mikrotubulů a centra organizující mikrotubuly (MTOC, centrozom) či cytoplazmatických inkluzí.

5.1. Struktura a tvar jádra

Znaky, které se ve světelném mikroskopu jeví u různých buněk jako stejné, mohou získat na mnohem větší důležitosti pro rozlišení druhů při pozorování pomocí elektronového mikroskopu. Tak je tomu i u jádra. Zatímco jeho velikost a počet nejsou velmi proměnlivé a nejdou jednoduše pro rozlišení druhu použít, jeho ultrastruktura má oproti tomu význam mnohem větší. Důležité je takové zobrazení například pro druh *Cochliopodium megatetrastylus* (Himatismenida), jeho jádro je velmi nepravidelné a vytváří mnoho laloků

a záhybů, které při pozorování světelným mikroskopem nejsou patrné (Anderson a Tekle, 2013), zatímco druh *C. barki* má jádro vždy hladké (Kudryavtsev a kol., 2004).

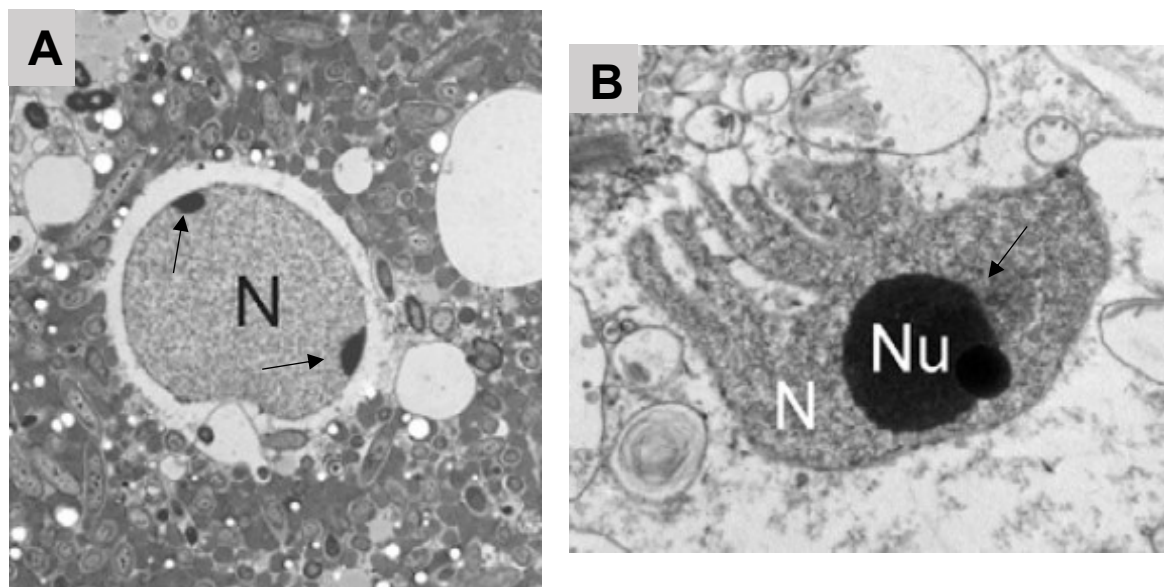
Dále se díky elektronové mikroskopii dají zobrazit i velmi nepatrné znaky, jako je struktura laminy obklopující jádro. Ta, přestože se druhově příliš často neliší, je přeci jen důležitá například pro rozlišení druhu *Amoeba proteus* (Euamoebida) s plástvovitou jadernou laminou od druhu *A. algonquinensis*, jehož jaderná lamina je amorfni (Baldock, 1983).

5.2. Velikost, tvar a poloha jadérka

Stejně jako jádro, i jadérko nabývá různých velikostí, počtů, struktury a má i různé umístění uvnitř jádra v závislosti na jednotlivých druzích. Díky velikosti jadérka se dají rozlišit nejenom rody – rod *Luapelamoeba* (Acanthamoebida) s jadérkem mnohem větším než u rodu *Acanthamoeba* (Shadwick a kol., 2016) – lze odlišit i příbuzné druhy. Velikost jadérka je pro rozlišení druhů často důležitější než samotná velikost jádra. Je využita například pro rozlišení druhu *Mayorella vespertilioides* (Dermamoebida) s jadérkem o velikosti 11 μm a druhu *M. penardi* s jadérkem 4 μm velkým (Mrva, 2011).

Výjimečně se druhy vymezují počtem jadérek, obvykle ale jádro obsahuje jadérka nanejvýš dvě. Příkladem je druh *Dermamoeba algensis* (Dermamoebida), mající jedno jadérko, na rozdíl od druhu *D. granifera*, který má jadérka dvě (Smirnov, 2017), nebo druh *Anaeramoeba oblonga* s jedním jadérkem odlišující se od druhu *A. flamelloides*, který má v jádře jadérka nejčastěji dvě (Táborský a kol., 2017).

Nejrozmanitější, co se týče druhů, je tvar samotného jadérka a jeho umístění. Druh *Ripella decalvata* (Vannellida) s hladkým tvarem jadérka tak může být odlišen od druhu *R. tribonemae* s nerovnoměrným a na povrchu lalokovitým jadérkem (Kudryavtsev a Gladkikh, 2017). Jadérko se také může odlišovat svojí fragmentací, tak je tomu například u druhu *Rhizamoeba neglecta* (Leptomyxida), jehož jádro může obsahovat kromě jednoho oválného jadérka i fragmenty jadérka druhého, zatímco u vzhledem podobného druhu *R. australiensis* je pouze jediné oválné jadérko (Smirnov a kol., 2009). Polohou jadérka v jádře se odlišují například druhy rodu *Anaeramoeba* – *A. flamelloides* s parietálním jadérkem (obr. 7A) od druhu *A. ignava* s jedním excentricky uloženým jadérkem (obr. 7B; Táborský a kol., 2017).



Obr. 7: Jadérka (šipky) druhu *Anaeramoeba flamelloides* (A) a druhu *A. ignava* (B) (upraveno podle: Tábořský a kol., 2017)

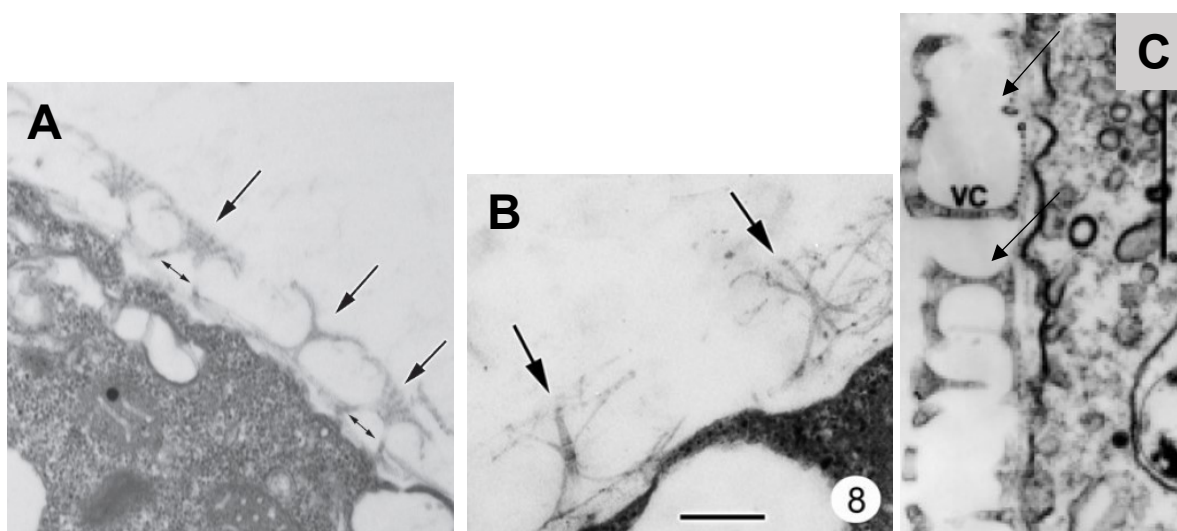
5.3. Povrch buňky

Povrch měňavky má pro rozlišení druhů velký význam, samotná odlišná stavba povrchových struktur často vede k popisu nového druhu.

5.3.1. Šupiny

Druhově velmi různorodé jsou šupiny pokrývající povrch některých měňavek. Nejvíce se liší druhy v rámci rodu *Korotnevella* (Dactylopodida), kde jsou většinou dva typy šupin, z nichž jeden je nejčastěji druhově specifický (Udalov a kol., 2017). Příkladem je *K. fousa*, která má na rozdíl od druhu *K. novazelandica* (Udalov a kol., 2017) na šupinách „sombrořovitého“ tvaru i strukturu připomínající obrácenou sukni obkružující ze středu šupiny vycházející žebro; dále mu úplně chybí druhý typ šupin (Udalov, 2016). Šupiny loďkovitého tvaru jsou například u druhu *K. heteracantha* anebo *K. limbata*, ale u prvního ze zmíněných druhů je navíc přítomný hrot vycházející z jedné strany šupiny (Udalov, 2015). Dále jsou šupiny důležité pro třídu Cutosea obsahující čtyři rody s podobnými šupinami. Každý z rodů zahrnuje pouze jeden druh, tři z nich jsou si navzájem velmi podobné velikostí i stavbou povrchu, ale nepatrně se odlišují strukturou svých šupin (Lahr a kol., 2015). Všechny šupiny jsou oválné a velmi malé, ale nejmenší jsou u druhu *Armaparvus languidus* (Squamocutida; Schuler a Brown, 2018). U druhu *Squamamoeba*

japonica mají šupiny ztlustělou prostřední část, na které nesou vlákno (Kudryavtsev a Pawlowski, 2012), zatímco u druhu *Sapocribrum chincoteaguense* žádná ztlustění ani vlákna nejsou, a dokonce je šupina uprostřed proděravělá (Lahr a kol., 2015). Jako hlavní rozlišovací znak slouží šupiny i pro rod *Cochliopodium* (Himatismenida), ve kterém se druhy dělí podle tvaru šupin do tří kategorií. Pro druhy z první kategorie jsou typické věžovité šupiny s trychtýřovitým límcem – příkladem může být druh *C. megatetrastylus* (obr. 8A; Anderson a Tekle, 2013). Druh *C. pentatrifurcatum* je řazen do druhé kategorie – vytváří věžovité šupiny s vertikálním žebrem procházejícím bazálním plátem (obr. 8B; Tekle et al., 2013). V poslední, třetí kategorii, jsou druhy s variabilními šupinami, které ale nikdy nejsou věžovité – například druh *C. larifeili*, který má šupiny krychlovité (obr. 8C; Kudryavtsev, 1999).



Obr. 8: Šupiny (šipky) druhu *Cochliopodium pentatrifurcatum* (A) (upraveno podle: Tekle a kol., 2013), druhu *C. megatetrastylus* (B) (upraveno podle: Anderson a Tekle, 2013) a druhu *C. larifeili* (C) (upraveno podle: Kudryavtsev, 1999)

5.3.2. Glykokalyx

Důležitý je i samotný glykokalyx (plášť), odlišovat se může u příbuzných druhů tloušťkou – druh *Thecamoeba aesculea* (Thecamoebida) s glykokalyxem o tloušťce 20 μm a druh *T. sphaeronucleus*, jehož glykokalyx je tlustý 50 μm (Kudryavtsev a Hausmann, 2009). Plášť druhu *Vannella ebro* (Vennellida) na sobě zase nenese žádná jednoduchá vlákna, čímž se liší od druhu *V. arabica* (Smirnov, 2001) a plášť druhu *Hartmannella abertawensis* (Euamoebida) obsahuje, na rozdíl od druhu *H. vacuolata*, pyramidovité jednotky (Anderson a kol., 1997). Tvorba kutikuly – vícevrstevného glykokalyxu – je typická pro druhy rodu

Pellita (Pellitida), a přestože se jednotlivé druhy na základě přítomnosti kutikuly nedají odlišit, může být použita alespoň pro odlišení od příbuzného rodu *Gocevia*, jehož zástupci mají na těle podobnou strukturu, která ale na rozdíl od kutikuly pellit neobklopuje celé tělo (Smirnov, 2005). Kutikula na sobě ale může nést i vrstvu glykostylů a podle nich se už druhy odlišovat dají.

Glykostyly (tj. dlouhé, polysacharidové útvary) pro odlišení druhů nemají tak velký význam jako třeba šupiny, stále jsou ale pro některé skupiny důležité. Z řádu Vannellida se tak může vymezit druh *Vannella peregrinia*, který má glykostyly mnohem jemnější, kratší a méně uspořádané než ostatní druhy (Smirnov a Fenchel, 1996). Dokonce i samotnou přítomností glykostylů se příbuzné druhy mezi sebou liší – druh *Ripella delcavata*, bez glykostylů od druhu *R. tribonemae*, který vytváří pětiúhelníkové glykostyly (Kudryavtsev a Gladkikh, 2017).

5.4. Organely a cytoplazmatické inkluze

Tvorba organel s výrazně odlišnou stavbou není u druhů jednoho rodu příliš častá a děje se tak převážně pouze u krist mitochondrií a diktyozomů Golgiho aparátu, a to pouze výjimečně. Příkladem takového rozdílu jsou mitochondrie druhu *Cochliopodium pentatrifurcatum* (Himatismenida), jehož kristy jsou tubulo-diskoidální (Tekle a kol., 2013), zatímco kristy ostatních druhů z rodu – například druhu *C. arabianum* – jsou kristy pouze tubulární (Tekle a kol., 2015). Odlišnost diktyozomů pak spočívá výhradně v jejich množství u jednotlivých druhů. Druh *Sappinia platani* (Thecamoebida) se tak může vymezit od ostatních kongenerických druhů díky přítomnosti mnohem většího počtu diktyozomů (Wylezich a kol., 2015).

Pomocí elektronového mikroskopu je možné pozorovat i elektron-denzní tělíska, která se výjimečně vyskytují uvnitř granuloplazmy těsně pod cytoplazmatickou membránou, a mohou dopomoci k rozlišení druhu. Tato tělíska jsou přítomna například u druhu *Cunea thuwala* (Dactylopodida), a naopak nejsou u morfologicky jinak téměř totožného druhu *C. profunda* (Kudryavtsev a Pawlowski, 2015). V některých měňavkách se také vyskytují lipidové globule, a přestože bývají časté, jejich přítomnost se liší spíše na úrovni rodů než druhů. Jedním z mála příkladů, kde se od sebe druhy liší přítomností těchto globulí, je *Dermamoeba algensis* (Dermamoebida) s jejich absencí a *D. granifera*, obsahující jich velké množství (Smirnov, 2017).

5.5. MTOC (centrozom)

Centra organizující mikrotubuly se vyskytují především u druhů v řádu Himatismenida, Pellitida a Acanthamoebida nebo také v rodě *Anaeramoeba*. Jejich význam pro odlišení druhů pak může být dán samotnou přítomností těchto center, kdy například u druhů *Cochliopodium larifeili* a *C. galicum* (Himatismenida) je přítomné a velmi výrazné, zatímco u druhu *C. megatetrastylus* se vyskytuje pouze výjimečně (Tekle a Williams, 2016). U druhů anaeraméb je centrum organizující mikrotubuly mnohem různorodější, ať už svojí velikostí nebo polohou. Tak se odlišuje například druh *A. parva*, který má centrozom asociovaný s jádrem a velikostně nejmenší z celého rodu, zatímco *A. flamelloides* ho má od jádra oddělený, a druh *A. gargantua* má centrozom největší (Táborský a kol., 2017).

6. Molekulární fylogenetika

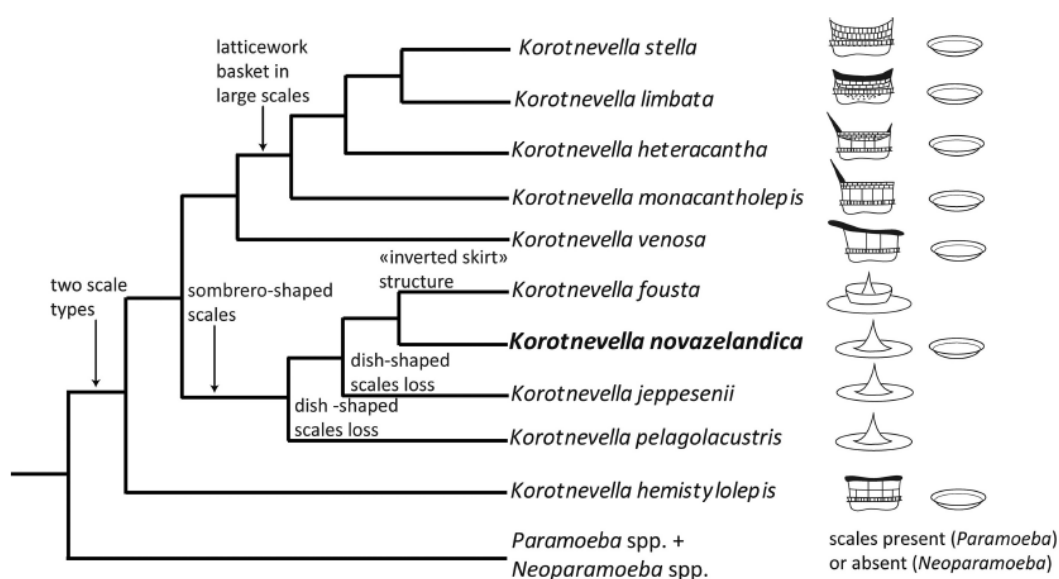
Molekulární metody se už dnes používají pro odlišování druhů lobosních měňavek běžně (sekvenční data jsou prakticky ke všem nově popsáným druhům k dispozici už přibližně 20 let). I druhy, které jsou od sebe morfologicky nebo ultrastrukturně neodlišitelné, mohou být geneticky velmi odlišné (kryptické druhy), a naopak (vzácněji) druhy, které si nejsou vzhledově podobné, mohou být téměř nerozlišitelné v sekvencích genů (Nassonova a kol., 2010). Odlišování druhů pouze na základě morfologie tak může výrazně podceňovat jejich počet (Tekle, 2014). Na druhou stranu, odlišování druhů měňavek pouze na základě sekvenčních dat může vést k výraznému nadhodnocení jejich počtu (viz níže). Pro molekulární rozlišení druhů a určení jejich pozice na fylogenetickém stromě se nejčastěji používá gen pro SSU rRNA (tj. gen pro molekulu RNA v malé podjednotce ribosomu) a o něco méně i gen pro aktin. Pro identifikaci druhu se také často využívá metod barcodingu, při které se vytvoří značka ze sekvence určitého genu, díky níž se pak mohou druhy vzájemně porovnávat. Tato metoda je u lobosních měňavek založená nejčastěji na sekvenování podjednotky I mitochondriální cytochrom c oxidázy (COI), často využívané jsou ale i sekvence ITS (internal transcribed spacer 1 a 2). Pomocí sekvenčních dat se mohou určovat a porovnávat mezidruhové i vnitrodruhové genetické vzdálenosti.

Dříve, než se začalo se sekvenací DNA, byly pro určování genetických vzdáleností druhů využívané metody DNA fingerprintingu – RFLP (polymorfismus délky restričních fragmentů), při které se odlišné sekvence projeví prostřednictvím gelové elektroforézy,

po rozštěpení restriční endonukleázou na různě dlouhé fragmenty (např. Bogler, 1983), a RAPD (náhodná amplifikace polymorfní DNA), při které se porovnávají amplifikované, náhodné úseky genomu prostřednictvím gelové elektroforézy (Hadrys a kol., 1992). Také se využívalo rozdílné struktury izozymů (izoenzymů; proteinů s odlišnou primární strukturou; De Jonckheere, 1983). Určit hranice vnitrodruhové a mezidruhové variability sekvencí a značek pro popis nového druhu je ovšem dosti složité a je nutné je stanovit pro každý rod (ne-li skupinu druhů) zvlášť.

6.1. Geny pro SSU rRNA a aktin

Při popisu nových druhů se už standardně sekvenuje gen pro SSU rRNA. Například pro odlišení druhů akantaméb byl už v začátcích molekulární éry sestaven systém sekvenčních typů, které se od sebe vzájemně musí lišit genetickou vzdáleností minimálně 5 % (Stothard a kol., 1998), tak se může vymezit *Acanthamoeba byersi* od nejpříbuznějších druhů (Qvarnstrom a kol., 2013). Druhy řádu Vannellida se mohou lišit i jen o 0,6-0,9 % (Nassonova a kol., 2010). Zato druh *Thecamoeba cosmophorea* (Thecamoebida) se liší od blízce příbuzného druhu *T. quadrilineata* až o 30 % (Mesentsev a Smirnov, 2019). Mezi druhy anaeraméb je genetická vzdálenost také poměrně vysoká, nejbližší si jsou druhy *A. megacephala* a *A. oblonga* s 13% odlišností (Táborský a kol., 2017). Rozdělení druhů rodu *Korotnevella* pomocí genu pro SSU rRNA se dokonce shoduje s jejich dělením na základě morfologie jejich šupin (obr. 9; Udalov a kol., 2017).



Obr. 9: Fylogenetický strom druhů rodu *Korotnevella* vytvořený na základě SSU rRNA se zobrazenou morfologií šupin (Udalov et al., 2017).

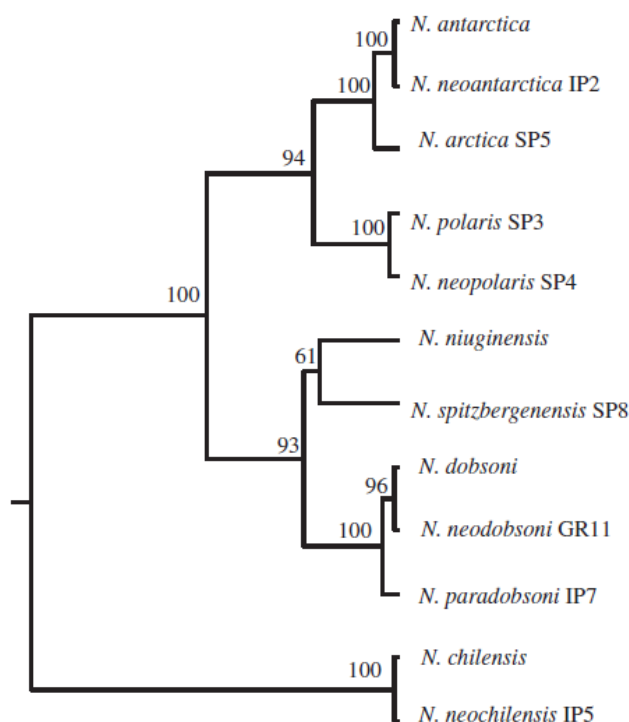
Kromě sekvence genu pro SSU rRNA se využívá i jeho délka a GC obsah. Délkou genu pro SSU rRNA se liší například druh *Mayorella gemmifera* s 2863 bp od příbuzného, zatím nepopsaného druhu JJP-2003 s 2131 bp (Dyková a kol., 2008). GC obsahem v genu pro SSU rRNA se pak například odlišují příbuzné druhy *Anaeramoeba flamelloides* (Anaeramoebidae) s 39-40 % a *A. megacephala* s 30 % (Táborský a kol., 2017). Kromě samotného složení molekuly tohoto genu je důležitá také sekundární struktura jeho produktu, tj. SSU rRNA (nejčastěji struktura variabilního V4 regionu), která se může u některých druhů lišit – tak je to například u druhu *Flamella pleistocenia*, který se liší rozdílnou strukturou V4 regionu od všech ostatních druhů rodu (Shmakova a kol., 2016). Od ostatních druhů rodu se tak odlišuje i například druh *Anaeramoeba flamelloides* (Anaeramoebidae), jehož molekula SSU rRNA jako jediná obsahuje helix 45e/1.

Kromě genu pro SSU rRNA se využívá i aktin-kódujícího genu (ale o něco vzácněji), pomocí jehož se dá rozlišit například druh *Cunea profundata* (Dactylopodida) od druhu *C. thuwala* (Kudryavtsev a Pawlowski, 2015).

6.2. COI a ITS barcoding

Gen pro SSU rRNA hrál dříve pro rozlišení druhů měňavek z říše Amoebozoa velkou roli, a přestože je považován za věrohodný „marker“ pro tvorbu fylogenetických stromů a je stále nejpoužívanějším lokusem pro rozlišování samotných druhů, dnes se přikládá velký význam i novějším metodám jako je DNA barcoding s použitím sekvencí genu pro COI a ITS sekvencí (Nassonova a kol., 2010). Tak je tomu hlavně kvůli vysokému vnitrodruhovému polymorfismu těchto „markerů“ v porovnání s nízkou evoluční rychlostí genu pro SSU rRNA mezi blízkými druhy lobosních měňavek (Smirnov a kol., 2007). COI barcoding je nejpoužívanější, nejprozkoumanější a pravděpodobně i nejvíce spolehlivý u rodů *Cochliopodium* (Himatismenida; Tekle, 2014), *Vannella* (Vannellida; Nassonova a kol., 2010) a *Korotnevella* (Dactylopodida; Zlatogursky a kol., 2016). Mezidruhová variabilita sekvencí zde výrazně překračuje variabilitu vnitrodruhovou – například pro druh *Vannella simplex* se vnitrodruhovými variabilitou pohybuje kolem 0,1 %, zatímco mezidruhovými je v rámci příbuzných druhů v rozmezí 4,3-12,6 % (Nassonova et al., 2010). Pro ostatní rody není COI barcoding příliš používán, není tedy jasné, zda se dá používat univerzálně. Také zatím není známa prahová hodnota sekvencí („barcoding gap“), závisící na rozdílech vnitrodruhových a mezidruhových genetických vzdáleností v rámci jednotlivých skupin, díky kterým by tato metoda byla plně spolehlivá (Tekle, 2014).

Pro druhy, u kterých se COI barcoding nedá využít (nemají mitochondriální genom nebo jimi nelze stanovit rozdíly mezi jinak prokazatelně různými druhy), je využívána sekvence ITS (ITS barcoding). Tyto sekvence se využívají zejména u heteroloboseí, bývají často jediným způsobem pro odlišení druhů rodu *Naegleria* (původně vymezovaných pomocí izozymové analýzy), které mohou být morfologicky zcela totožné. A protože mají naeglerie většinou ITS sekvenci vnitrodruhově identickou, začaly se mezidruhově rozlišovat na základě nepatrných změn v této sekvenci – například *N. antarctica* se liší délkou od druhu *N. neoantarctica* pouze jedním bp – třemi substitucemi a jednou delecí – v sekvenci ITS2 (obr. 10; De Jonckheere, 2006a) nebo druh *N. canariensis*, který se od druhu *N. gallica* dokonce ani neliší délkou sekvencí, ale pouze dvěma substitucemi v ITS2 sekvenci (De Jonckheere, 2006b). I když se tyto sekvence velmi často využívají pro popis druhů, někdy může být jejich použití problematické. Tak je tomu například u druhu *N. fowleri*, který má na rozdíl od ostatních naeglerií ITS sekvence dosti variabilní (může mít až čtyři typy) a nelze ho tak tímto způsobem jednoznačně vymezit jako jeden druh (De Jonckheere, 2004). Není také příliš jisté, jestli i ostatní rody polyfyletické čeledi Vahlkampfiidae, pro které se tato metoda běžně (na základě výsledků u naeglerií) používá, nemohou mít v této sekvenci určitou variabilitu a být tak tudíž nesprávně klasifikovány. Uvažována není ani žádná variabilita v těchto sekvencích u kmenů jednoho druhu, je tedy dost pravděpodobné, že je popisováno více druhů, než je ve skutečnosti třeba (Pánek a kol., 2012).



Obr. 10: Fylogenetický strom druhů rodu *Naegleria* sestavený na základě ITS sekvencí (De Jonckheere, 2006a).

6.3. RFLP, RAPD, izozymy

Metody molekulárního popisu druhů, při kterých by se nevyužívalo sekvenování genů, se už dnes příliš nepoužívají, dříve ale hrály velkou roli. Díky RFLP tak bylo možné odlišit blízké příbuzné druhy pomocí genetické vzdálenosti, například druhy *Acanthamoeba sohi* (Acanthamoebida) a *A. royreba* (Im a Shin, 2003). Pomocí RAPD pak bylo možné zjistit index podobnosti druhů, ten je například pro druhy *A. sohi* a *A. hatchetti* 0,959 (Im a Shin, 2003). Na základě izozymové analýzy bylo možné díky rozdílným zymogramům odlišit druhy *A. jacobsi* a *A. culbertsoni* (Sawyer a kol., 1992). Také výše zmiňované druhy naeglerií byly původně rozlišované pomocí izozymové analýzy a na základě tohoto rozdělení je bylo později (s nástupem sekvenování) možné vymezit i ITS sekvencemi (De Jonckheere, 1998; De Jonckheere, 2002). Od těchto metod se ale pro popis nových druhů už ustoupilo, protože jejich výsledky nelze snadno reprodukovat.

6.4. Kryptické druhy

Díky krátkým, jednolokusovým „markerům“, jako jsou zejména geny pro COI a ITS sekvence, je možné odhalit a popsat mnohem více nových druhů s velmi odlišnými sekvencemi odrážejícími evoluční vývoj, které by se pouze na základě totožné morfologie určily jako jeden druh. Takto geneticky odlišné, ale morfologicky stejné druhy se označují jako druhy kryptické. „Markerové“ sekvence jsou zatím prozkoumané u relativně malého počtu rodů, proto se množství kryptických druhů bude pravděpodobně v budoucnu s nárůstem nových sekvenací zvyšovat. Pouze na základě molekulárních metod se rozlišují například všechny druhy rodu *Cunea* (Dactylopodida), které jsou morfologicky i ultrastrukturně v podstatě totožné, ale výrazně se liší genem pro SSU rRNA i COI (Kudryavtsev a Volkova, 2020). Také v rámci rodu *Cochliopodium* (Himatismenida) jsou kryptické druhy relativně dobře popsány, protože je u něj dobře prozkoumaný gen pro COI u velkého množství druhů. Dalšími kryptickými druhy ze skupiny Discosea jsou ještě například *Thecamoeba quadrilineata* a *T. cosmophorea* (Thecamoebida), které se morfologicky liší pouze nepatrně, kdežto geneticky se liší značně (Mesentsev a Smirnov, 2019) nebo druh *Ripella tribonemae* (Vannellida), která se od ostatních druhů rodu liší nejznatelněji molekulárně (Kudryavtsev a Gladkikh, 2017). Kryptickými druhy jsou i výše zmiňované druhy naeglerií, které jsou morfologicky nerozlišitelné a odlišují se nepatrnými změnami v ITS sekvenci.

V rámci tohoto přístupu ale existuje i mnoho úskalí, které mohou vést ke špatné identifikaci již popsaných či nesprávnému určení nových kryptických druhů. Výsledky sekvencí jednotlivých druhů se mohou lišit v návaznosti na fyziologický stav buněk, na fázi jejich vývojového cyklu, na podmínkách prostředí a v neposlední řadě i díky možné nízké kvalitě získaných dat a sekvenčním chybám. Pro rod *Cochliopodium* byla tato úskalí rozřešena například pomocí tvorby „bioinformatické pipeline“ porovnávající jednotlivé druhy. Tyto druhy tak mají stanovené mezidruhové a vnitrodruhové hranice sekvencí na 2 % a kryptické druhy mohou být tímto způsobem ověřeny (Tekle a Wood, 2018). Také použití samostatných ITS sekvencí pro popis nového kryptického druhu nemusí být vždy úplně průkazné. Přestože může dobře sloužit pro identifikaci druhů naeglerií, pro popis nových kryptických druhů čistě na tomto základě může vést k tvorbě mnohem většího počtu druhů (viz výše). Také vztahením tohoto konceptu na ostatní vahlkampfidy může docházet ke špatnému vymezení druhů a tedy k celkovému výraznému nadhodnocování jejich počtu, protože pro ně zatím není určena vnitrodruhová diverzita sekvencí, podle které by se tyto druhy věrohodně rozdělily (Pánek a Čepička, 2012).

7. Fyziologie

Kromě morfologie, ultrastruktury a molekulární fylogenetiky může být pro druhy specifická i jejich fyziologie. Zejména pro parazitické druhy je známá rozdílná tolerance teploty, podle toho, v jakém hostiteli se vyskytují. Pro druh *Protacanthamoeba bohemica* (Acanthamoebida), který se vyskytuje v rybách, je tak ideální růstová teplota 4 °C, zatímco druh *P. invadens*, žijící v myších je ideální teplota 42 °C (Dyková a kol., 2005). U příbuzných druhů je častá i tolerance odlišného pH. Pro druh *Tetramitus thermacidophilus* (Heterolobosea) jsou nejlepší růstové podmínky v prostředí s pH v rozmezí 1,2-5 (Baumgartner a kol., 2009), zatímco pro druh *T. rostratus* je ideální prostředí s téměř neutrálním pH v rozmezí 6,8-7,3 (Brent, 1954). Důležitá je i tolerance různé salinity. Například druh *Tulamoeba peronaphora* (Heterolobosea) se přirozeně vyskytuje v prostředí se salinitou v rozmezí 293-300 ‰ (Park a kol., 2009), na rozdíl od druhu *T. bucina*, který toleruje salinitu 34-225 ‰ (Kirby a kol., 2015). Druh, vyskytující se v určitém extrémním prostředí, je tak téměř automaticky popsán jako druh nový (např. *Echinamoeba thermarum* – Echinamoebida; Baumgartner a kol., 2003).

Přestože pro rozlišení některých druhů může být fyziologie významná, pro většinu druhů buď důležitá není, anebo není udaná při popisu nového druhu a nejde jednoduše srovnat s fyziologií jiných druhů. To, jak velká důležitost je fyziologii přikládána pro rozdělování měňavek do druhů, se tak různí u jednotlivých autorů.

8. Závěr

Morfologické a ultrastrukturní znaky byly dříve (před začátkem sekvenování DNA) používány jako jediné pro popis nových druhů lobosních nahých měňavek. Některé tyto znaky mohou být použité pro popis druhu i dnes, často se ale mezi jednotlivými druhy překrývají a samy o sobě většinou k identifikaci druhu nestačí. Samostatně používané znaky jsou nejčastěji šupiny a glykostyly, které jsou mnohdy pro některé druhy typické. Naopak znaky, jako je například velikost nebo tvar buňky či jádra, jsou i v rámci jednoho druhu velmi proměnlivé a spíše než pro samotný popis druhu dopomáhají ke správné druhové identifikaci. Navíc při přípravě preparátů pro elektronovou mikroskopii může docházet ke vzniku artefaktů fixace, které mohou vést k nesprávné identifikaci (Kudryavtsev a Hausmann, 2009). S nástupem molekulárních metod se začaly druhy popisovat i na základě sekvencí genu pro SSU rRNA a případně COI a ITS barcodingu. Sekvenování některých izolátů bez morfologického popisu a pouze na základě nepatrných rozdílů v sekvencích může vést k nadhodnocení počtu nově popsáných druhů (popisu velkého množství kryptických druhů; De Jonckheere a kol., 2012; Mesentsev a Smirnov, 2019). Proto je dnes k popisu nového druhu lobosních měňavek nutná unikátní kombinace několika morfologických a ultrastrukturních znaků společně s dostatečně odlišnými sekvencemi genů pro SSU rRNA, případně COI nebo sekvence ITS. U různých skupin měňavek jsou ale tyto odlišnosti ve vzdálenostech mezidruhových i vnitrodruhových sekvencí různé a jejich hranice nejsou zatím jednotně stanovené.

Důležitost znaků a sekvencí se tak liší u každého druhu a také u každého z autorů popisujících nový druh. Pro vymezení nového druhu měňavek nejsou žádná pravidla platící obecně pro všechny rody, podle kterých by se musel každý autor řídit. U některých izolátů tak může být sporné, jestli je popsat jako nové druhy, anebo přiřadit k již známým druhům. Pro věrohodnější identifikaci by tedy bylo dobré získat sekvence z většího množství druhů a kmenů měňavek a na jejich základě stanovit mezidruhové a vnitrodruhové prahové hranice sekvencí pro každý rod, ze kterých by pak druhy mohly být jednodušeji určeny. Tímto

způsobem by ale zároveň s nepřihlédnutím k morfologii také mohlo docházet k opomíjení nově objevených druhů, které by měly tyto hranice sekvencí odlišné.

Přestože nejsou zatím hranice sekvencí jednotlivých druhů pevně stanovené, díky molekulárním metodám se v poslední době stále zvyšuje množství popisů nově vznikajících druhů lobosních měňavek. Této problematice se ale přes relativně velké množství měňavek věnuje poměrně málo výzkumných týmů, navíc sekvenace tak velkého množství vzorků je časově velmi náročná, proto není jasné, kdy (a jestli vůbec) bude nějakou univerzální hranici pro delimitaci druhů možné aplikovat.

Články a poznatky o lobosních měňavkách a jejich delimitaci, které jsem pro sepsání této práce shromáždila, se chystám zúročit i v rámci svého magisterského projektu, ve kterém se budu zabývat heterolobosními měňavkami ze skupiny Psalteriomonadidae.

9. Zdroje

- Amaral-zettler, L., Cole, J., Laatsch, A. D. & Nerad, T. A. (2006). *Vannella epipetala* n. sp. isolated from the leaf surface of *Spondias mombin* (Anacardiaceae) growing in the dry forest of Costa Rica. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 53(6), 522–530.
- Fishbeck, D.W. & Bovee, E. C. (1993). Two new amoeba *Striamoeba sparolata* n. sp. and *Flamella tiara* n. sp. from fresh water. *Ohio Journal of Science*, 93 (5), 134–139.
- Anderson, O. R., Rogerson, A. & Hannah, F. (1997). Three new limax amoebae isolated from marine surface sediments: *Vahlkampfia caledonica* n. sp., *Saccamoeba marina* n. sp., and *Hartmannella vacuolata* n. sp. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 44(1), 33–42.
- Anderson, O. R. & Tekle, Y. I. (2013). Description of *Cochliopodium megatetrastylus* n. sp. isolated from a freshwater habitat. *Acta protozoologica*, 52, 55–64.
- Baldock, B. M., Rogerson, A. & Berger, J. (1983). A new species of fresh-water amoeba: *Amoeba algonquinensis* n. sp. (Gymnamoebia). *Transactions of the American Microscopical Society*, 102(2), 113–121.
- Baumgartner, M., Eberhardt, S., De Jonckheere, J. F. & Stetter, K. O. (2009). *Tetramitus thermacidophilus* n. sp., an amoeboflagellate from acidic hot springs. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(2), 201–206.
- Baumgartner, M., Yapi, A., Gröbner-Ferreira, R. & Stetter, K. O. (2003). Cultivation and properties of *Echinamoeba thermarum* n. sp., an extremely thermophilic amoeba thriving in hot springs. *Extremophiles*, 7(4), 267–274.
- Bogler, S. A., Zarley, C. D., Burianek, L. L., Fuerst, P. A. & Byers, T. J. (1983). Interstrain mitochondrial dna polymorphism detected in *Acanthamoeba* by restriction endonuclease analysis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 8, 145–163.
- Brent, M. M. (1954). Nutritional studies on the amoeba-flagellate, *Tetramitus rostratus*. *The University of Chicago Press in association with the Marine Biological Laboratory*, 106(3), 269–278.
- Brown, S. & De Jonckheere, J. F. (2004). Isolation of a new vahlkampfiid amoeba from soil: *Paravahlkampfia lenta* n. sp. *European Journal of Protistology*, 40(4), 289–294.
- Cavalier-smith, T., Chao, E. E. & Lewis, R. (2016). Molecular phylogenetics and evolution 187-gene phylogeny of protozoan phylum Amoebozoa reveals a new class (Cutosea) of deep-branching, ultrastructurally unique, enveloped marine Lobosa and clarifies amoeba evolution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 99, 275–296.
- Claußen, M. & Schmidt, S. (2017). Locomotion pattern and pace of free-living amoebae – a microscopic study. *Microscopy and Imaging Science: Practical Approaches Research and Education*, 223–230.
- Cole, J., Anderson, O. R., Tekle, Y. I., Grant, J., Katz, L. A., & Nerad, T. (2010). A description of a new "Amoebozoan" isolated from the american lobster, *Homarus americanus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 57(1), 40–47.
- Corsaro, D., Michel, R., Walochnik, J., Müller, K. D. & Greub, G. (2010). *Saccamoeba lacustris*, sp. nov. (Amoebozoa: Lobosea: Hartmannellidae), a new lobose amoeba, parasitized by the novel chlamydia "*Candidatus Metachlamydia lacustris*" (Chlamydiae: Parachlamydiaceae). *European Journal of Protistology*, 46(2), 86–95.
- De Jonckheere, J. F. (1998). Sequence variation in the ribosomal internal transcribed spacers, including the 5.8S rDNA, of *Naegleria* spp. *Protist*, 149(3), 221–228.
- De Jonckheere, J. F. (2002). A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozoologica*, 41(4), 309–342.
- De Jonckheere, J. F. (2004). Molecular definition and the ubiquity of species in the genus

- Naegleria*. *Protist*, 155(1), 89–103.
- De Jonckheere, J. F. (2006a). Isolation and molecular identification of free-living amoebae of the genus *Naegleria* from Arctic and sub-Antarctic regions. *European Journal of Protistology*, 42(2), 115–123.
- De Jonckheere, J. F. (2006b). Isolation and molecular identification of vahlkampfiid amoebae from an island (Tenerife, Spain). *Acta protozoologica*, 45, 91–96.
- De Jonckheere, J. F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing, and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *The Journal of Protozoology*, 30(4), 701–706.
- De Jonckheere, J. F., Brown, S., Walochnik, J., Aspöck, H. & Michel, R. (2005). Morphological investigation of three *Tetramitus* spp. which are phylogenetically very closely related: *Tetramitus horticulus*, *Tetramitus russelli* n. comb. and *Tetramitus pararusselli* n. sp. *European Journal of Protistology*, 41(2), 139–150.
- De Jonckheere, J. F. De, Gryseels, S. & Eddyani, M. (2020). Knowledge of morphology is still required when identifying new amoeba isolates by molecular techniques. *European Journal of Protistology*, 48(3), 178–184.
- Del Valle, A. O. F., Lorenzo-Morales, J. & Maciver, S. K. (2017). *Leptomyxa valladaresi* n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida), from Mount Teide, Tenerife, Spain. *Experimental Parasitology*, 183, 85–91.
- Dyková, I., Pecková, H. & Kostka, M. (2008). Introduction of *Mayorella gemmifera* Schaefer, 1926 into phylogenetic studies of Amoebozoa. *Acta protozoologica*, 47, 205–210.
- Dyková, I., Veverková-Fialová, M., Fiala, I. & Dvořáková, H. (2005). *Protacanthamoeba bohémica* sp. n., isolated from the liver of tench, *Tinca tinca* (Linnaeus, 1758). *Acta Protozoologica*, 44(4), 369–376.
- Dyková, I., Kostka, M. & Pecková, H. (2010). Two new species of the genus *Stenamoeba* Smornov, Nassonova, Chao et Cavalier-Smith, 2007. *Acta protozoologica*, 49, 245–251.
- Dyková, I., Kostka, M. & Pecková H. (2011). Three new species of the amoebozoan genus *Vexillifera* Schaeffer, 1926. *Acta protozoologica*, 50, 57–65.
- Garstecki, T., Brown, S. & De Jonckheere, J. F. (2005). Description of *Vahlkampfia signyensis* n. sp. (Heterolobosea), based on morphological, ultrastructural and molecular characteristics. *European Journal of Protistology*, 41(2), 119–127.
- Geisen, S., Weinert, J., Kudryavtsev, A. & Glotova, A. (2014). Two new species of the genus *Stenamoeba* (Discosea, Longamoebia): Cytoplasmic MTOC is present in one more amoebae lineage. *European Journal of Protistology*, 50, 153–165.
- Glotova, A. & Smirnov, A. (2017). Description of *Flamella daurica* n. sp., with notes on the phylogeny of the genus *Flamella* and related taxa. *European Journal of Protistology*, 58, 164–174.
- Hadrys, H., Balick, M. & Schierwater, B. (1992). Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. *Molecular Ecology*, 1, 55–63.
- Hayes, C. (1955). *Amoeba taylorae* n. sp. *Journal of Cell Science*, 96, 375–381.
- Im, K. I., & Shin, H. J. (2003). *Acanthamoeba sohi*, n. sp., a pathogenic korean isolate YM-4 from a freshwater fish. *The Korean Journal of Parasitology*, 41(4), 181–188.
- Kalinina, L. V., Afon'kin, S. Y., Gkomov, D. B., Khrebtukova, I. A. & Page, F. C. (1986). *Amoeba borokensis* n. sp., a rapidly dividing organism especially suitable for experimental purposes. *Archiv Fur Protistenkunde*, 132(4), 343–361.
- Kelly, C. J. O., Silberman, J. D., Amaral, L. A., Nerad, T. A. & Sogin, M. L. (2003). *Monopylocystis visvesvarai* n. gen., n. sp. and *Sawyeria marylandensis* n. gen., n. sp.: Two new amitochondrial heterolobosean amoebae from anoxic environments. *Protist*,

- 154, 281–290.
- Kirby, W. A., Tikhonenkov, D. V., Mylnikov, A. P., Janouškovec, J., Lax, G. & Simpson, A. G. B. (2015). Characterization of *Tulamoeba bucina* n. sp., an extremely halotolerant amoeboflagellate heterolobosean belonging to the Tulamoeba-Pleurostomum clade (Tulamoebidae n. fam.). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(2), 227–238.
- Kostka, M., Lares-Jiménez, L. F., Tylm, T. & Dyková, I. (2017). *Copromyxa laresi* n. sp. (Amoebozoa: Tubulinea) and transfer of *Cashia limacoides* (Page, 1967) to *Copromyxa* Zopf, 1885. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(2), 173–182.
- Kudryavtsev, A. (2004). Description of *Cochliopodium spiniferum* sp. n., with notes on the species identification within the genus *Cochliopodium*. *Acta protozoologica*, 43, 345–349.
- Kudryavtsev, A. (2014). *Paravannella minima* n. g. n. sp. (Discosea, Vannellidae) and distinction of the genera in the vannellid amoebae. *European Journal of Protistology*, 50, 258–269.
- Kudryavtsev, A. A. (1999). Description of *Cochliopodium larifeili* n. sp. (Lobosea, Himatismenida), an amoeba with peculiar scale structure, and notes on the diagnosis of the genus *Cochliopodium* (Hertwig and Lesser, 1874) Bark, 1973. *Protistology*, 1(2), 66–71.
- Kudryavtsev, A., Brown, M. W., Tice, A., Spiegel, F. W., Pawlowski, J. & Anderson, O. R. (2014). A revision of the order Pellitida Smirnov et al., 2011 (Amoebozoa, Discosea) based on ultrastructural and molecular evidence, with description of *Endostelium crystalliferum* n. sp. *Protist*, 165(2), 208–229.
- Kudryavtsev, A., Brown, S. & Smirnov, A. (2004). *Cochliopodium barki* n. sp. (Rhizopoda, Himatismenida) re-isolated from soil 30 years after its initial description. *European Journal of Protistology*, 40(4), 283–287.
- Kudryavtsev, A. & Gladkikh, A. (2017). Two new species of *Ripella* (Amoebozoa, Vannellida) and unusual intragenomic variability in the SSU rRNA gene of this genus. *European Journal of Protistology*, 61, 92–106.
- Kudryavtsev, A. & Hausmann, K. (2009). *Thecamoeba aesculea* n. sp. (Amoebozoa, Thecamoebidae), a Terrestrial Amoeba with Affinities to *Th. sphaeronucleolus* (Greeff, 1891). *Acta protozoologica*, 48, 91–96.
- Kudryavtsev, A. & Pawlowski, J. (2011). Description of *Paramoeba atlantica* n. sp. (Amoebozoa, Dactylopodida) – a marine amoeba from the eastern Atlantic, with emendation of the dactylopodid families. *Acta protozoologica*, 50, 239–253.
- Kudryavtsev, A. & Pawlowski, J. (2012). *Squamamoeba japonica* n. g. n. sp. (Amoebozoa): A deep-sea amoeba from the Sea of Japan with a novel cell coat structure. *Protist*, 164(1), 13–23.
- Kudryavtsev, A. & Pawlowski, J. (2015). *Cunea* n. g. (Amoebozoa, Dactylopodida) with two cryptic species isolated from different areas of the ocean. *European Journal of Protistology*, 51, 197–209.
- Kudryavtsev, A., Pawlowski, J. & Smirnov, A. (2018). More amoebae from the deep-sea: Two new marine species of *Vexillifera* (Amoebozoa, Dactylopodida) with notes on taxonomy of the genus. *European Journal of Protistology*, 66, 9–25.
- Kudryavtsev, A. & Volkova, E. (2020). *Cunea russae* n. sp. (Amoebozoa, Dactylopodida), another cryptic species of *Cunea* Kudryavtsev and Pawlowski, 2015, inhabits a continental brackish-water biotope. *European Journal of Protistology*, 73, 125–685.
- Kudryavtsev, A., Wylezich, C. & Pawlowski, J. (2011). *Ovalopodium desertum* n. sp. and the phylogenetic relationships of Cochliopodiidae (Amoebozoa). *Protist*, 162(4), 571–589.
- Kudryavtsev, A., Wylezich, C., Schlegel, M. & Walochnik, J. (2009). Ultrastructure, SSU

- rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of *Flamella* Schaeffer, 1926 (Amoebozoa), with description of three new species. *Protist*, 160, 21–40.
- Kühn, S. F. (1997). *Rhizamoeba schneepfii* sp. nov., a naked amoeba feeding on marine diatoms (North Sea, German Bight). *Archiv Für Protistenkunde*, 147(3-4), 277–282.
- Lahr, D. J. G., Grant, J., Molestina, R., Katz, L. A. & Anderson, O. R. (2015). *Sapocribrum chincoteaguense* n. gen. n. sp.: A small, scale-bearing amoebozoan with flabellinid affinities. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 62(4), 444–453.
- Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., Leedale, G. F., Loeblich, A. R., Lom, III. J., Lynn, D., Merinfeld, E. G., Page, F. C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F. G. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *The Journal of Protozoology*, 27(1), 37–58.
- Lewis, E. J. & Sawyer, T. K. (1979). *Acanthamoeba tubiashi* n. sp., a new species of freshwater amoebida (Acanthamoebidae). *Transactions of the American Microscopical Society*, 98(4), 543–549.
- Melton, III. J. T., Singla, M., Wood, F. C., Collins, S. J. & Tekle, Y. I. (2019). Three new freshwater *Cochliopodium* species (Himatismenida, Amoebozoa) from the southeastern United States. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 0, 1–13.
- Mesentsev, Y. S. & Smirnov, A. V. (2019). An example of sibling species within the genus *Thecamoeba*. *European Journal of Protistology*, 67, 132–141.
- Michel, R. & Smirnov, A. V. (1999). The Genus *Flamella* Schaeffer, 1926 (Lobosea, Gymnamoebia), with description of two new species. *European Journal of Protistology*, 35, 403–410.
- Michel, R., Wylezich, C., Hauröder, B. & Smirnov, A. (2006). Phylogenetic position and notes on the ultrastructure of *Sappinia diploidea* (Thecamoebidae). *Protistology*, 4(4), 319–325.
- Mrva, M. (2011). *Mayorella vespertilioides* Page, 1983 (Amoebozoa) – new host for the ectoparasitic fungus *Amoebophilus simplex* (Zygomycota). *Biologia*, 66(4), 645–647.
- Nassonova, E., Smirnov, A., Fahrni, J., & Pawlowski, J. (2010). Barcoding amoebae: comparison of SSU, ITS and COI genes as tools for molecular identification of naked lobose amoebae. *Protist*, 161(1), 102–115.
- Pánek, T. & Čepička, I. (2012). Diversity of Heterolobosea. *Genetic Diversity in Microorganisms*, 3–26.
- Pánek, T., Ptáčková, E. & Čepička, I. (2014). Survey on diversity of marine/saline anaerobic Heterolobosea (Excavata: Discoba) with description of seven new species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64(7), 2280–2304.
- Pánek, T., Silberman, J. D., Yubuki, N., Leander, B. S. & Čepicka, I. (2012). Diversity, evolution and molecular systematics of the Psalteriomonadidae, the main lineage of anaerobic/microaerophilic heteroloboseans (Excavata: Discoba). *Protist*, 163(6), 807–831.
- Park, J. S. & Simpson, A. G. B. (2016). Characterization of a deep-branching heterolobosean, *Pharyngomonas turkanaensis* n. sp., isolated from a non-hypersaline habitat, and ultrastructural comparison of cysts and amoebae among *Pharyngomonas* Strains. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63(1), 100–111.
- Park, J. S., Simpson, A. G. B., Brown, S. & Cho, B. C. (2009). Ultrastructure and molecular phylogeny of two heterolobosean amoebae, *Euplaesiobystra hypersalinica* gen. et sp. nov. and *Tulamoeba peronaphora* gen. et sp. nov., isolated from an extremely hypersaline habitat. *Protist*, 160(2), 265–283.
- Peglar, M. T., Nerad, T. A. & Anderson, O. R. (2016). *Stenamoeba polymorpha*, a new species isolated from domesticated horse *Equus ferus caballus*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 63, 698–708.

- Pussard, M., & Pons, R. (1977) Morphologie de la paroi kystique et taxonomie du genre *Acanthamoeba* (Protozoa, Amoebida). *Protistologica*, 13, 557–598.³
- Qvarnstrom, Y., Nerad, T. A., Visvesvara, G. S. & Campus, P. W. (2013). Characterization of a new pathogenic *Acanthamoeba* species, *A. byersi* n. sp., isolated from a human with fatal amoebic encephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60, 626–633.
- Robinson, B. S., De Jonckheere, J. F. & Dobson, P. J. (2007). Two new *Tetramitus* species (Heterolobosea, Vahlkampfiidae) from cold aquatic environments. *European Journal of Protistology*, 43(1), 1–7.
- Sawyer, T., Nerad, T. & Visvesvara, G. (1992). *Acanthamoeba jacobsi* sp. n. (Protozoa: Acanthamoebidae) from sewage contaminated ocean sediments. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 59(2), 223–226.
- Shadwick, L. L., Brown, M. W., Tice, A. K. & Spiegel, F. W. (2016). A new amoeba with protosteloid fruiting: *Luapeleamoeba hula* n. g. n. sp. Acanthamoebidae, Centramoebida, Amoebozoa). *Acta protozoologica*, 55, 123–134.
- Shmakova, L., Bondarenko, N. & Smirnov, A. (2016). Viable species of *Flamella* (Amoebozoa: Variosea) isolated from ancient Arctic. *Protist*, 167(1), 1330.
- Smirnov, A. (2009). Amoebas, Lobose. *Encyclopedia of Microbiology*, 558–577.
- Smirnov, A. & Goodkov, A. (1994). Freshwater gymnamoebae with a new type of surface structure *Paradermamoeba valamo* and *P. levis* sp. n. (Thecamoebidae), and notes on the diagnosis of the family. *Acta Protozoologica*, 33(2), 109–115.
- Smirnov, A. (2018). Fine structure of *Leptomyxa ambigua* n. sp. CCAP 1546/2 strain, formerly known as “*Rhizamoeba flabellata*” (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida). *European Journal of Protistology*, 62, 95–100.
- Smirnov, A. & BROWN, S. (2004). Guide to the methods of study and identification of soil gymnamoebae. *Protistology*, 3(3), 148–190.
- Smirnov, A., Nassonova, E., Fahrni, J. & Pawlowski, J. (2009). *Rhizamoeba neglecta* n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea) from the bottom sediments of freshwater Lake Leshevoe (Valamo Island, North-Western Russia), with notes on the phylogeny of the order Leptomyxida. *European Journal of Protistology*, 45(4), 251–259.
- Smirnov, A. V. & Fenchel, T. (1996). *Vahlkampfia anaerobica* n. sp. and *Vannella peregrinia* n. sp. (Rhizopoda) anaerobic amoebae from a Marine sediment. *Archiv Fur Protistenkunde*, 147(2), 189–198.
- Smirnov, A. V., Nassonova, E. S., Chao, E. & Cavalier-Smith, T. (2007). Phylogeny, evolution, and taxonomy of vannellid amoebae. *Protist*, 158(3), 295–324.
- Smirnov, A. V. (1999). *Korotnevelia diskophora* n. sp. (Gymnamoebia, Paramoebidae) - small freshwater amoeba with peculiar scales. *Protistology*, 33, 30–33.
- Smirnov, A. V. (2001). *Vannella ebro* n. sp. (Lobosea, Gymnamoebia), isolated from cyanobacterial mats in Spain. *European Journal of Protistology*, 153, 147–153.
- Smirnov, A. V., Bondarenko, N., Glotova, A. & Nassonova, E. (2016). Morphology and phylogeny of *Vannella croatica* n. sp. (Amoebozoa, Discosea, Vannellida). *European Journal of Protistology*, 52, 65–72.
- Smirnov, A. V. & Brown, S. (2000). First isolation of a cyst-forming *Vannella* species, from soil – *Vannella persistens* n. sp. (Gymnamoebia, Vannellidae). *Protistology*, 1(3), 120–123.
- Smirnov, A. V. & Kudryavtsev, A. A. (2005). Pellitidae n. fam. (Lobosea, Gymnamoebia) - A new family, accommodating two amoebae with an unusual cell coat and an original mode of locomotion, *Pellita catalonica* n. g., n. sp. and *Pellita digitata* comb. nov. *European Journal of Protistology*, 41, 257–267.

³ Sekundární citace

- Smirnov, A. (2017). *Dermamoeba algensis* n. sp (Amoebozoa, Dermamoebidae) - an algivorous lobose amoeba with complex cell coat and unusual feeding mode. *European Journal of Protistology*, 47, 67–78.
- Smirnov, A. V. (1999). Re-description of *Thecamoeba munda* Schaeffer 1926 (Gymnamoebia, Thecamoebidae), isolated from the Baltic Sea. *European Journal of Protistology*, 69, 66–69.
- Sprague, V., Beckett, R. L. & Sawyer, T. K. (1969). A new species of *Paramoeba* (Amoebida, Paramoebidae) parasitic in the crab *Callinectes sapidus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 14(2), 167–174.
- Stothard, D. R., Schroeder-Diedrich, J. M., Awwad, M. H., Gast, R. J., Ledee, D. R., Rodriguez-Zaragoza, S., Dean, Ch., L., Fuerst, P., A. & Byers, T. J. (1998). The evolutionary history of the genus *Acanthamoeba* and the identification of eight new 18S rRNA gene sequence types. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(1), 45–54.
- Stratford, M. P. & Griffiths, A. J. (1978). Variations in the properties and morphology of cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of General Microbiology*, 108, 33–37.
- Táborský, P., Pánek, T. & Čepička, I. (2017). Anaeramoebidae fam. nov., a novel lineage of anaerobic amoebae and amoeboflagellates of uncertain phylogenetic position. *Protist*, 168(5), 495–526.
- Tekle, Y. I. (2014). DNA barcoding in amoebozoa and challenges: The example of *Cochliopodium*. *Protist*, 165(4), 473–484.
- Tekle, Y. I., Gorfu, L. A., Anderson, O. R. & Southwest, S. L. (2015). *Cochliopodium arabianum* n. sp. (Amorphea, Amoebozoa). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 623–628.
- Tekle, Y. I., Roger, A. O., Lecky, A. F., Kelly, S. D. & Southwest, S. L. (2013). A new freshwater amoeba: *Cochliopodium pentatrifurcatum* n. sp. (Amoebozoa, Amorphea). *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 60, 342–349.
- Tekle, Y. I. & Williams, J. R. (2016). Cytoskeletal architecture and its evolutionary significance in amoeboid eukaryotes and their mode of locomotion. *Royal Society Open Science*, 3(9), 1–11.
- Tekle, Y. I. & Wood, F. C. (2018). A practical implementation of large transcriptomic data analysis to resolve cryptic species diversity problems in microbial eukaryotes. *BMC Evolutionary Biology*, 18(1), 1–13.
- Tymł, T., Lares-Jiménez, L. F., Kostka, M. & Dyková, I. (2017). *Neovahlkampfia nana* n. sp. reinforcing an underrepresented subclade of Tetramitia, Heterolobosea. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 64(1), 78–87.
- Udalov, I. A. (2015). Cyst-forming amoebae of the genus *Korotnevella* Goodkov, 1988 (Amoebozoa: Dactylopodida), with description of two new species. *European Journal of Protistology*, 51, 480–493.
- Udalov, I. A. (2016). *Pseudoparamoeba microlepis* n. sp., *Korotnevella foushta* n. sp. (Amoebozoa, Dactylopodida), with notes on the evolution of scales among dactylopodid amoebae. *European Journal of Protistology*, 54, 33–46.
- Udalov, I. A., Eckhard, V. & Smirnov, A. (2017). *Korotnevella novazelandica* n. sp. (Amoebozoa, Discosea, Dactylopodida) – a new freshwater amoeba with unusual combination of scales. *Protistology*, 11(4), 238–247.
- Udalov, I. A., Lee, W. J., Lotonin, K. & Smirnov, A. (2016). *Pseudoparamoeba garorimi* n. sp., with notes on species distinctions within the genus. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 0, 1–8.
- Visvesvara, G. S. (1991). Classification of *Acanthamoeba*. *Reviews of Infectious Diseases*, 13(5), 369–372.
- Visvesvara, G. S., De Jonckheere, J. F., Marciano-Cabral, F. & Schuster, F. L. (2005).

- Morphologic and molecular identification of *Naegleria dunnebackei* n. sp. isolated from a water sample. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 52(6), 523–531.
- Visvesvara, G. S., Sriram, R., Qvarnstrom, Y., Bandyopadhyay, K., Da Silva, A. J., Pieniazek, N. J. & Cabral, G. A. (2009). *Paravahlkampfia francinae* n. sp. masquerading as an agent of primary amoebic meningoencephalitis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 56(4), 357–366.
- Volkova, E. & Kudryavtsev, A. (2017). Description of *Neoparamoeba longipodia* n. sp. and a new strain of *Neoparamoeba aestuarina* (Page, 1970) (Amoebozoa, Dactylopodida) from deep-sea habitats. *European Journal of Protistology*, 61, 107–121.
- Volkova, E., Völcker, E., Clauß, S., Bondarenko, N. & Kudryavtsev, A. (2019). *Paramoeba aparasomata* n. sp., a symbiont-free species, and its relative *Paramoeba karteshi* n. sp. (Amoebozoa, Dactylopodida). *European Journal of Protistology*, 71, 1–14.
- Walthall, A. C., Tice, A. K. & Brown, M. W. (2016). A new species of *Flamella* (Amoebozoa, Variosea, Gracilipodida) isolated from a freshwater pool in southern Mississippi, USA. *Acta protozoologica*, 55, 111–117.
- Wylezich, C., Walochnik, J., Corsaro, D. & Michel, R., Kudryavtsev, A. (2015). Electron microscopical investigations of a new species of the genus *Sappinia* (Thecamoebidae, Amoebozoa), *Sappinia platani* sp. nov., reveal a dictyosome in this genus. *Acta protozoologica*, 54, 45–51.
- Zlatogursky, V. V., Kudryavtsev, A., Udalov, I. A., Bondarenko, N., Pawlowski, J. & Smirnov, A. (2016). Genetic structure of a morphological species within the amoeba genus *Korotnevella* (Amoebozoa: Discosea), revealed by the analysis of two genes. *European Journal of Protistology*, 56, 102–111.